

ヒストンバリエント H3.Y を含むヌクレオソームの
構造と機能に関する研究

Structural and functional studies of histone variant
H3.Y nucleosome

2018 年 2 月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科
電気・情報生命専攻 構造生物学研究

鯨井 智也

Tomoya KUJIRAI

目次

略語一覧

第 1 章 序論

- 1-1 真核生物におけるゲノム DNA 収納機構
- 1-2 クロマチン構造とヌクレオソーム
- 1-3 ヒストン翻訳後修飾
- 1-4 ヒストンバリエーション
- 1-5 ヒストン H3.X 及び H3.Y
- 1-6 リンカーヒストン
- 1-7 ヌクレオソーム構造変化と DNA 機能発現
- 1-6 本研究について

第 2 章 実験方法

- 2-1 リコンビナントタンパク質の精製
- 2-2 ヌクレオソーム及びテトラソームの再構成
- 2-3 H3.Y を含むヌクレオソームの結晶化及び構造決定
- 2-4 マイクロコッカルヌクレアーゼアッセイ
- 2-5 リンカーヒストン H1 結合アッセイ及び H1-ヌクレオソーム複合体のマイクロコッカルヌクレアーゼアッセイ
- 2-6 ヒドロキシルラジカルフットプリントアッセイ

2-7 熱安定性アッセイ

2-8 ポリヌクレオソームの再構成

2-9 分析超遠心による沈降速度解析

第3章 結果

3-1 序

3-2 H3.Yを含むヌクレオソームの再構成及び構造解析

3-3 H3.Yを含むヌクレオソームのマイクロコッカルヌクレアーゼに対する感受性解析

3-4 H3.Yを含むポリヌクレオソームの形態解析

3-5 リンカーヒストン H1 結合解析

3-6 H3.Yを含むヌクレオソームの構造安定性解析

3-7 H3.3 及び H3.Y を含むヘテロヌクレオソームの再構成及び機能解析

第4章 総合討論

4-1 序

4-2 H3.Yがクロマチン構造に与える影響についての考察

4-2-1 H3.Yを含むヌクレオソームが緩んだクロマチンを形成する性質についての考察

4-2-2 H3.Yを含むヌクレオソームの安定性についての考察

4-3 H3.Yとヒストンシャペロンの関係

4-4 今後の展望

引用文献

謝辞

研究業績

略語一覽

BSA	:	bovine serum albumin
CBB		coomassie brilliant blue
DAPI	:	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	:	deoxyribonucleic acid
DEAE	:	diethylaminoethyl
DTT	:	dithiothreitol
EDTA	:	ethylenediaminetetraacetic acid
FRAP	:	fluorescence recovery after photobleaching
EtBr	:	ethidium bromide
Ni-NTA	:	nickel-nitrilotriacetic acid
PAGE	:	polyacrylamide gel electrophoresis
PEG	:	polyethylene glycol
PMSF	:	phenylmethylsulfonyl fluoride
SDS	:	sodium dodecyl sulfate
Tris	:	tris (hydroxymethyl) aminomethane

第 1 章 序論

1-1 真核生物におけるゲノム DNA 制御機構

生物の遺伝情報は、ゲノム DNA にコードされている。ヒトでは、ゲノム DNA は約 30 億塩基対からなり、長さにすると約 2 m に相当する。この 2 m もの長さの DNA は、高度に折りたたまれることで、わずか 10 μ m 程度の核に収納されている。DNA が高度に折りたたまれるために、DNA に様々な核内タンパク質が結合したクロマチンが形成されている。細胞核という小さな空間において、クロマチンは高度に凝縮しているにもかかわらず、クロマチンを中心とした様々な生命現象が起こっている。代表例として、DNA を複製する反応、DNA を読み取り RNA を合成する転写反応、損傷を受けた DNA を修復する反応である。このような様々な反応が正確に、適切な時期に、適切な場所において起こるためには、クロマチンは無秩序に凝縮されているわけではなく、秩序だった状態で細胞核に収納されていることが考えられる。細胞核内には、ユークロマチンと、ヘテロクロマチンと呼ばれる領域が存在していることが知られている。これらの領域は、顕微鏡下において DNA の染色液である DAPI の染色の程度により区別され、ユークロマチンは細胞核内において比較的薄く染色されるクロマチンの密度が小さい領域であり、ヘテロクロマチンは比較的濃く染色されるクロマチンの密度が大きい領域である (Heitz E., 1928)。ユークロマチンは、クロマチンが緩んだ形態となっており、一方で、ヘテロクロマチンは、クロマチンは凝縮した形態となっていると考えられている。これまでの解析から、ユークロマチンでは、転写が活発に起きている遺伝子領域等を含んでおり、ヘテロクロマチンは、セントロメア領域や、テロメア領域、遺伝子が不活性化されている領域等を含んでいることが知られている (Lamond A.I., et al., 1998, Cremer T.

and Cremer C., 2001, Schneider R. and Grosschedl R., 2007)。このような特徴的なクロマチン領域が形成されることで、DNA の様々な機能制御が実現されていると考えられている。このようなクロマチン領域の形成には、クロマチンの構造の基本的な構造であるヌクレオソームが非常に重要であることが明らかにされてきた。

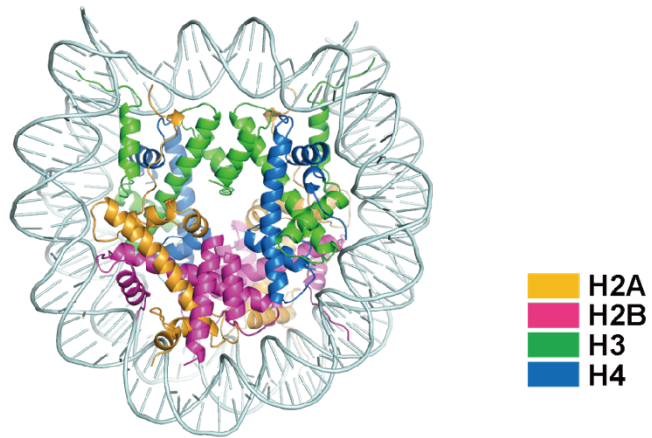
1-2 クロマチン構造とヌクレオソーム

ヌクレオソームは、Olins&Olins 及び Woodcock により 1973 年に発見された（論文発表は Olins AL. and Olins DE., 1974)。1974 年に Olins&Olins のグループ、Kornberg のグループ、Kornberg 及び Thomas らのグループよりヌクレオソームがクロマチンの基本単位であることが提唱された（Kornberg RD., 1974, Kornberg RD. and Thomas JO, 1974, Olins AL. and Olins DE., 1974)。1997 年に、Richmond らのグループにより、X 線結晶構造解析により、ヌクレオソームの原子分解能の立体構造が決定された（Luger K., et al., 1997)。ヌクレオソームは、4 種類のヒストンタンパク質 H2A、H2B、H3、H4 を二分子ずつ含む円盤状構造のヒストン八量体に、約 150 塩基対程度の DNA が左巻きに巻きついた直径 11 nm の円盤状の構造体である（図 1A)。ヒストンタンパク質は、アルギニン、リジンなどの塩基性のアミノ酸を多く含んでおり、これらのアミノ酸が DNA と相互作用することで、DNA を高度に折り曲げている。ヒストンタンパク質は、ヒストンフォールドと呼ばれる α -ヘリックスが連なる特徴的なモチーフを有しており、さらに、それぞれのヒストンはヒストンフォールドドメインに追加される形で様々な領域を有している（図 1B)。どのヒストンも共通して、構造を持つコア領域と特定の構造を持たないテール領域から構成される。4 種類のヒストンタンパク質は、それ

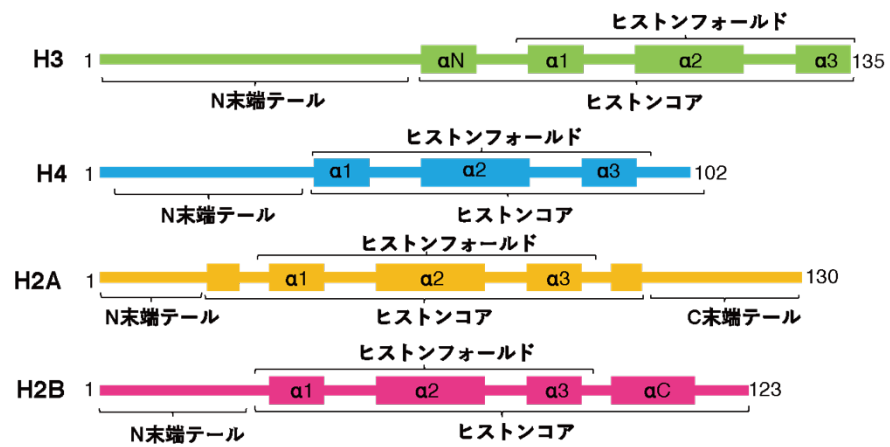
ぞれ特異的な組み合わせで結合する。一分子の H3 及び一分子の H4 が結合しヘテロ二量体を形成し、ヘテロ二量体が H3 の C 末端 α -ヘリックスにより会合しホモ四量体を形成する。また、一分子の H2A と一分子の H2B が結合し、ヘテロ二量体構造を形成する。さらに、H3-H4 四量体に、二分子の H2A-H2B 二量体及び DNA が結合し、ヌクレオソームが形成される。ヌクレオソームは、このように階層的に形成されると考えられている (Venkatesh S. and Workman JL., 2015) (図 1C)。

クロマチンは、ヌクレオソームが数珠状に連なった構造体である。クロマチンの構造変化と、DNA の機能制御には密接な関係がある。緩んだクロマチン構造においては、DNA の機能発現は促進されていると考えられているが、一方で凝縮したクロマチンでは DNA 結合タンパク質の結合部位が埋もれており、DNA への結合が阻害され、DNA の機能発現は抑制されることが考えられている (Luger K., et al., 2012)。このようなクロマチンの構造変化は、エピジェネティックマークと呼ばれる、ヒストン翻訳後修飾、ヒストンバリエント、ヌクレオソーム結合因子 (リンカーヒストン等) などにより誘起されることが考えられている。このような様々な因子群により、ヌクレオソームとヌクレオソームの相互作用や、DNA とヒストンの相互作用、及びヒストンとヒストンの相互作用、そして、ヌクレオソームの結合因子等が変化し、結果として、非常に多様な特徴を持つヌクレオソームが形成される。これらのヌクレオソーム多様性によって、クロマチンの構造変化が誘起され、そして DNA の機能が制御されていると考えられている (Luger K., et al., 2012, Venkatesh S. and Workman JL., 2015) (図 2)。

A



B



C

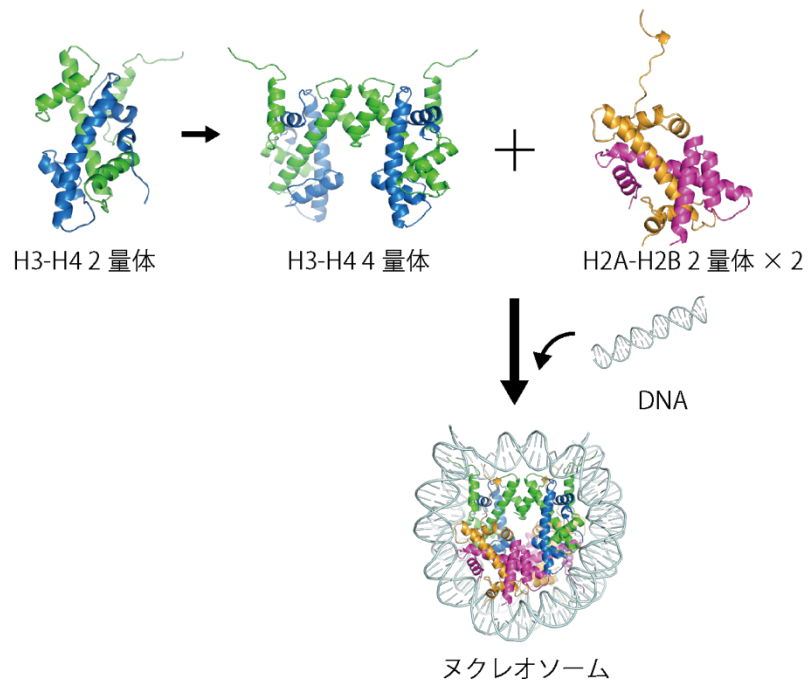


図 1. ヌクレオソームの構造。

(A) ヒトのヌクレオソームの結晶構造 (PDB code : 3AFA)。(B) ヒストンタンパク質の一次構造。ヒストンは、ヒストンフォールドドメインの他にそれぞれ独自のドメインを有している。ヌクレオソームコアより飛び出ている天然変性領域はテールと呼ばれている。(C) ヌクレオソームの階層的構成。H3-H4 二量体がホモ二量体を形成した後に二分子の H2A-H2B 二量体が及び DNA が結合し、ヌクレオソーム構造となる。ヌクレオソームは、このように階層的に形成されている。

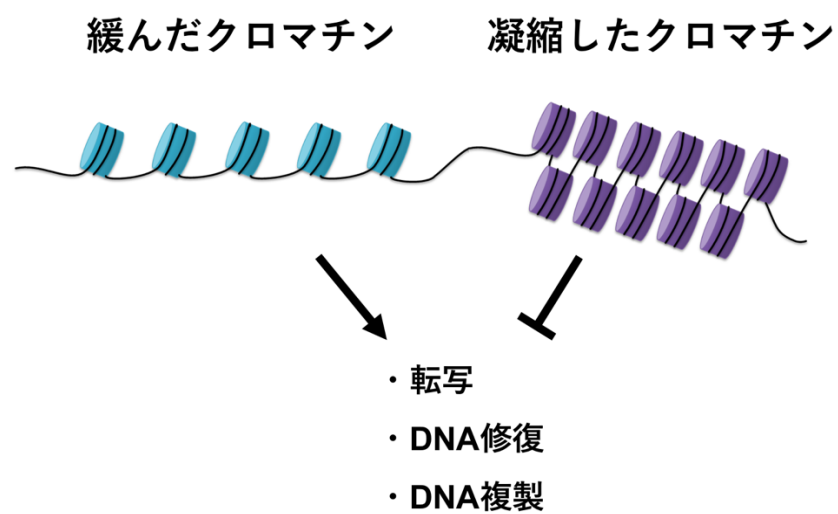


図 2. クロマチンの構造変化と DNA の機能制御。

クロマチンの構造変化により、核内タンパク質による DNA への結合に変化が生じ、結果として転写、DNA 修復、DNA 複製などの DNA の機能が制御されていると考えられている。

1-3 ヒストン翻訳後修飾

ヒストン翻訳後修飾は、ヒストンタンパク質に付加されるメチル化、アセチル化などの化学修飾である (Allfrey VG., 1964, Bannister AJ., Kouzarides T., 2011, Strahl BD., Allis CD., 2000)。近年の質量分析、次世代シーケンサー、そして、ヒストン修飾を認識する抗体の開発の進展により、ヒストン修飾に関する研究が急速に進んでいる。メチル化、アセチル化、リン酸化をはじめとして、多様なヒストン修飾が発見されており、今後も新たな修飾が発見される可能性が考えられる (Lawrence M., 2016)。これらの修飾の付加反応は、化学修飾の種類及びヒストンの修飾部位ごとに異なる酵素群が担っていることが報告されている (Strahl BD. and Allis CD., 2000, Rojas JR., 1999)。ヒストン修飾には、二つの機能が存在すると考えられている (Bannister AJ. and Kouzarides T., 2011)。一つ目は、ヒストン修飾が付加されることで、ヌクレオソームの構造が変化することである。その例として、ヒストン H3 の 122 番目のリジンがアセチル化されたヒストンは、プロモーターやエンハンサーに存在し、これらの修飾はヌクレオソームを不安定化させることが報告されている (Tropberger P., et al., 2013, Suzuki Y., et al., 2016)。二つ目の機能として、ヒストン修飾を認識するタンパク質群を呼び込む機能である。重要な例として、HP1 がヒストン H3 の 9 番目のトリメチル化リジンを認識してヌクレオソームに結合し、ヘテロクロマチン構造が形成されることが考えられている (Nakayama J., et al., 2001, Bannister AJ., et al., 2001)。また、酵母においては、アセチル化酵素複合体 SAGA が H3 の 4 番目のトリメチル化リジンを認識し、ヌクレオソーム中のヒストンをアセチル化することで転写反応が促進されることが明らかにされている (Bian C., et al., 2011)。これらの修飾を認識するタンパク質群についても、修飾が

付加されている残基だけでなく、周辺のアミノ酸を認識していることが明らかにされている (Strahl BD. and Allis CD., 2000, Jacobs SA., et al., 2002, Nielsen PR., et al., 2002, Bannister AJ. and Kouzarides T., 2011)。ヒストンバリエントは、主要型ヒストンとはアミノ酸配列が異なるため、修飾酵素や、認識タンパク質群の結合に変化が生じており、バリエントと修飾には特異的な組み合わせがあることが明らかにされている (Rogakou EP., et al., 1998, Wen H., et al., 2014, Szenker E., et al., 2011)。このような組み合わせを考慮すると、非常に多様なヒストン修飾が存在し、この多様性がクロマチンの機能制御を担っていると考えられる。

1-4 ヒストンバリエント

ヒストンには、主要型の他にヒストンバリエントと呼ばれる、主要型とはアミノ酸配列が異なるものの、主要型のヒストンと置きかわり、ヌクレオソームに取り込まれるタンパク質が存在している (Franklin SG. and Zweidler A., 1977)。ヒトにおいてはこれまでに、4種類のヒストンの中でも、H2A、H2B、H3においてヒストンバリエントが発見されている。特に研究が進んでいる H2A 及び H3 のヒストンバリエントを表に示す (表 1)。それぞれのバリエントは、特徴的なクロマチン領域に存在しており、そして特異的な機能があると考えられている (Talbert PB. and Henikoff S., 2017)。ヒストンバリエントをクロマチンに取り込ませる、もしくは取り外す因子として、ヒストンシャペロンが存在する。それぞれのバリエントには、対応するヒストンシャペロンが存在し、ヒストンシャペロンがバリエントを特定の領域に運び込むことが明らかにされている (Hammond CM., et al., 2017, Buschbeck M. and Hake SB., 2017)。ヒストンバリエン

トは、特定の領域に運び込まれた後に、ヌクレオソームの構造を変化させ、また、バリエーションを認識するタンパク質群を呼び込む機能を持つと考えられている (Buschbeck M. and Hake SB., 2017, Kurumizaka H., et al., 2013)。

ヒトの H2A のバリエーションとして、H2A.Z、H2A.X、macroH2A、H2A.B が知られている (Iouza N., et al., 1996, Eirín-López JM., et al., 2009, Chadwick BP. and Willard HF., 2001, Pehrson JR. and Fried VA., 1992, Bönisch C. and Hake SB., 2012)。

H2A.Z は、高度に保存されているバリエーションであり、酵母のような単細胞生物からヒトに至る高等真核生物において保存されている (Talbert PB. and Henikoff S., 2010, Malik HS. and Henikoff S., 2003)。H2A.Z は、転写開始点周辺や、ペリセントロメリックヘテロクロマチン等に存在していることが報告されている (Bönisch C. and Hake SB., 2012)。活発に転写されている転写開始点周辺に局在していることから、転写の開始において重要な機能をもつと考えられている (Bönisch C. and Hake SB., 2012)。また、H2A.Z は DNA 損傷部位に局在していることが明らかにされており、DNA 修復においても重要であると考えられている (Bönisch C. and Hake SB., 2012)。

H2A.B は、哺乳類特異的なヒストンバリエーションであり、不活性化 X 染色体に存在しないことから、H2A.Bbd (Barr-body deficient) とも呼ばれる (Chadwick BP. and Willard HF., 2001)。H2A.B は、エキソンとイントロンの境や、DNA 損傷部位に局在していることが報告されている (Tolstorukov MY., et al., 2012, Arimura Y., et al., 2013)。H2A.B を含むヌクレオソームでは、主要型の H2A を含むヌクレオソームとは巻きついている DNA の長さが異なっており、120 塩基対程度の DNA を巻きつけていることが報告されている (Bao Y., et al., 2004, Doyen CM., et al., 2006)。

ヒストン H3 には、主要型の H3.1 及び H3.2 をはじめとして、H3.3、H3T、H3.5、

H3.6、H3.7、H3.8、H3.X、H3.Y 及び CENP-A のバリエントが存在していることがこれまでに報告されている (Albig W., et al., 1996, Witt O., et al., 1996, Brush D., et al., 1985, Palmer DK., et al., 1987, Schenk R., et al., 2011, Wiedemann SM., et al., 2010, Taguchi H., et al., 2017)。H3.1 及び、H3.2 は、複製依存的にクロマチンに取り込まれることが知られており、ヒストンシャペロン CAF1 などに取り込みを行っていることが明らかにされている (Tagami H., et al., 2004)。

H3.3 は、酵母からヒトまで高度に保存されているバリエントであり、複製非依存的にクロマチンに取り込まれることが知られている (Szenker E., et al., 2011)。H3.3 は、活発に転写が行なわれている領域や、ヘテロクロマチン領域に存在しており、転写の活性化や、ヘテロクロマチン形成に重要な役割を果たしていると考えられている (Ahmad K. and Henikoff S., 2002, Szenker E., et al., 2011, Goldberg AD., et al., 2010)。特に、転写開始点周辺では、一分子のヌクレオソームの内に、H2A.Z との組み合わせの二種類のバリエントを含む、転写開始点特異的なヌクレオソームが形成されていることが報告されており、転写の開始に関与している可能性が考えられている (Jin C., et al., 2009)。

H3.3 のヒストンシャペロンとして、ヒストンシャペロン DAXX 及び HIRA が知られている (Tagami H., et al., 2004, Goldberg AD., 2010, Drané P., et al., 2010)。DAXX は、H3.3-H4 二量体と結合し、主要型の H3.1 と比較して H3.3 特異的アミノ酸である A87、I89、G90 を特異的に認識していることが明らかにされている (Elsässer SJ., et al., 2012)。

DAXX は、クロマチンリモデリング因子 ATRX と複合体となり H3.3 をヘテロクロマチンや、テロメア領域に運び込むことが知られている (Goldberg AD., 2010)。HIRA は、サブユニットである ubnuclein1 が H3.3 に結合し、DAXX と同様に A87、I89、G90 を認識することが明らかにされている (Ricketts MD., et al., 2015)。HIRA は、H3.3 を遺

伝子領域や、DNA 損傷部位に運び込むことが知られている (Ray-Gallet D., et al., 2011, Goldberg AD., 2010)。

CENP-A は、セントロメアに局在するヒストンバリエントである。セントロメアにおいて、CENP-A を含むヌクレオソームを足場として、様々なセントロメア形成因子群が集積することが明らかにされている (McKinley KL. and Cheeseman IM., 2016)。CENP-A を含むヌクレオソームは、DNA 末端の運動性が大きいことが報告されており、DNA 末端の運動性が正常な染色体分配に重要であると考えられている (Tachiwana H., et al., 2011, Roulland Y., et al., 2016)。

これらの知見から、ヒストンバリエントは特定のクロマチン領域に取り込まれ、その領域で機能を発揮していると考えられる。しかしながら、それぞれのヒストンバリエントのクロマチンにおける機能、そして、DNA の機能発現との関係については未だ解明されていない点が多い。

1-5 ヒストン H3.X 及び H3.Y

本研究において扱う H3.Y は、2010 年に Hake らのグループより発見された、霊長類特異的なヒストンバリエントである (Widemann SM., et al., 2010)。H3.Y は、H3.X とともに発見され、これらのバリエントは、H3.3 を認識するヒストンシャペロン DAXX や、HIRA の認識モチーフである A87、I89、G90 が保存されていることから、H3.3 の派生バリエントであると考えられている (Widemann SM., et al., 2010, Szenker E., et al., 2011) (図 3)。mRNA の発現解析から、H3.X または H3.Y は、正常組織では脳や精巣、がん組織では乳がん、肺がん、卵巣がんにおいて発現が確認されている (Widemann SM., et al., 2010)。さらに、免疫染色による解析から、胎児の脳の海馬の一部の神経細胞で

の発現が認められ、組織特異的発現をしている可能性が示唆されている。しかし、H3.X については、培養細胞においてはタンパク質レベルでの発現は確認されていない。H3.Y については、U2OS 細胞において発現しており、飢餓状態及び高密度培養により発現が 5~6 倍程度増加することが示されていることから、特定の外部刺激に応答して発現する可能性が考えられている。重要な知見として、H3.Y は、ユークロマチン領域に存在することが明らかにされており、また、H3.Y のノックダウンにより多くの遺伝子の発現レベルが低下することから、転写の活性化に関与していることが示唆されている (Widemann SM., et al., 2010)。さらに、H3.Y は、生体内においてヒストン H3.3 との組み合わせにおいて、ヌクレオソーム中に一分子の H3.3 及び一分子の H3.Y を含むヘテロヌクレオソーム形成している可能性が示唆されている (Widemann SM., et al., 2010)。最近、H3.Y の相互作用因子についての研究が発表され、H3.Y は、ヒストンシャペロン DAXX に結合しないことが明らかにされ、HIRA 依存的にクロマチンに取り込まれることが示唆されている (Zink LM., et al., 2017)。さらに、ヘテロクロマチンの構成因子である HP1 α や、SUV39H1 と共局在せず、転写の活性化に関与すると考えられているヒストンシャペロン FACT と共局在することが明らかにされている (Zink LM., et al., 2017)。これらの解析から、H3.Y は、ユークロマチンに存在し、遺伝子の転写を促進していると考えられるが、H3.Y を含むヌクレオソームの構造及びクロマチンの制御についての機能は明らかになっていない。

表 1. ヒストンバリエーションの種類とゲノム上での局在

バリエーション	ゲノム上での局在(発現組織)
H2A	ゲノム全体
H2A.Z	転写活性化領域、プロモーター、ヘテロクロマチン、制御領域等
H2A.X	ゲノム全体、DNA損傷部位
H2A.B	転写活性化領域、DNA損傷部位(脳及び精巣)
MacroH2A	ヘテロクロマチン
H3.1	ゲノム全体
H3.2	ゲノム全体
H3.3	転写活性化領域、プロモーター、ヘテロクロマチン、テロメア、DNA損傷部位、制御領域等
H3T	不明(精巣)
H3.5	転写活性化領域(精巣)
H3.6	不明
H3.7	不明(卵巣)
H3.8	不明
H3.X	不明(脳及び精巣、がん組織)
H3.Y	転写活性化領域(脳及び精巣、がん組織)
CENP-A	セントロメア

(Buschbeck M. and Hake SB.より引用、改変)

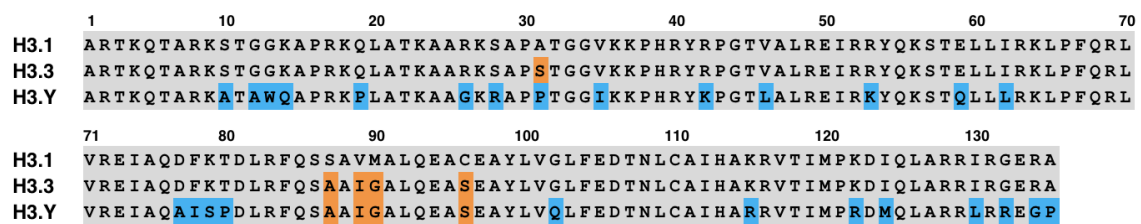


図 3. H3.1、H3.3、H3.Y のアミノ酸配列アライメント。

H3.Y 特異的なアミノ酸を水色、H3.3 及び H3.Y に保存されているアミノ酸を橙色で示した。

1-6 リンカーヒストン

リンカーヒストンは、ヌクレオソームに結合し、クロマチンを高度に凝縮させるタンパク質である。H1 は、リジン、アルギニンを多く持つ塩基性のタンパク質であり、構造を持つグロビュラー領域と、N 末端及び、C 末端に構造を持たないテール領域を持つ。H1 とヌクレオソームの複合体はクロマトソームと呼ばれ、これまでにクロマトソームの結晶構造及びクライオ電子顕微鏡による構造が明らかにされている (Bednar J., et al., 2017, Zhou BR., et al., 2015, Song F., et al., 2014)。結晶構造からリンカーヒストンは、ヌクレオソームのダイアド DNA 領域と、ヌクレオソームより突き出ているリンカー DNA 領域に結合することが明らかになっている (図 4)。H1 は、DNA の入り口と出口にあたる部分に結合することで、DNA を安定化させていると考えられている。ヒストンシャペロンとして、Nap1 及び SET (TAFI) が報告されており、これらの因子をはじめとして、様々な因子が H1 の取り込み、取り外しに関与していることが報告されている (Saeki H., et al., 2005, Shintomi K., et al., 2005, Kato K., et al., 2011, Iwafuchi-Doi M., et al., 2016)。

H1 の機能として、ヌクレオソーム DNA を安定化させるだけでなく、リンカー DNA 領域を覆っていることから、一般に、様々な DNA 結合タンパク質群の DNA への結合を阻害すると考えられている。これまでに、試験管内における実験から、H1 がクロマチンから取り除かれることで相同組換えが活性化されるという報告や、転写が活性化されるという報告がなされている (Machida S., et al., 2014, Zhang Q., et al., 2015)。また、生体内では、遺伝子の転写が活性化されるタイミングで、H1 が転写開始点近傍から解離するという報告や、活発に転写されている遺伝子では、H1 が転写開

始点近傍に少ない傾向があることが報告されている (Kadota S. and Nagata K., 2014, Iwafuchi-Doi M., et al., 2016, Izzo A., et al, 2013, Vicent GP., et al., 2011)。これらの知見から、H1 はヌクレオソームに結合することで、様々な因子の DNA への結合を制御しており、結果として DNA の機能発現を調節していると考えられる。

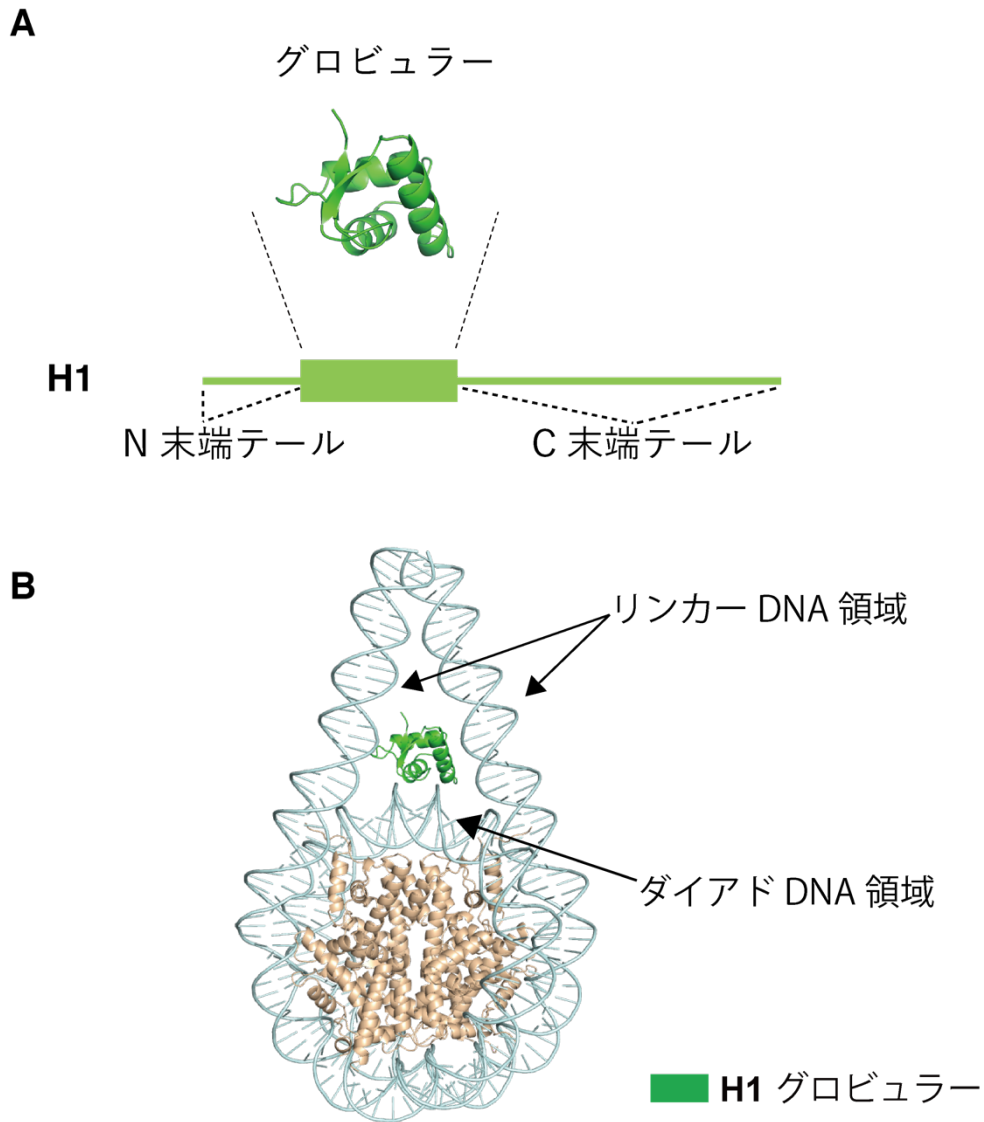


図 4. リンカーヒストン H1 とクロマトソーム。

(A) リンカーヒストン H1 の一次構造及びグロビュラードメインの立体構造。グロビュラードメインは、PDB code : 5LN0 を元に作図した。(B) クロマトソーム (H1-ヌクレオソーム複合体) の立体構造 (5LN0)。H1 の結合部位を点線で示した。H1 は、ヌクレオソームの DNA の入り口及び出口から伸びるリンカーDNA 及び、ヌクレオソームのダイアドに結合する。

1-7 ヌクレオソーム構造変化と DNA 機能発現

ヌクレオソームでは、ヒストンが DNA に結合しているため、様々な DNA 結合タンパク質のヌクレオソーム DNA への結合が抑制されると考えられている。そのため、ヌクレオソームは、DNA を凝縮させるために重要な一方で、結果として、DNA 修復、複製、転写等の DNA の機能発現に対して阻害的に働くと考えられてきた。生体内において DNA の機能発現が適切に実現するために、ヌクレオソーム構造は構造変化していると考えられ、実際にこれまでに、ヌクレオソーム構造は非常に動的に構造変化することが明らかにされてきた (Zlatanova J., et al., 2009, Li G. and Widom J. 2004)。その中でも、DNA 結合タンパク質のヌクレオソーム DNA へのアクセシビリティを変化させる構造変化として、“breathing”及び、“opening”が知られている。breathing は、ヌクレオソームの DNA の末端のみが一過的に短い範囲で解離する現象であり、opening は、ヌクレオソームから DNA が長い範囲で解離する現象である (図 5) (Zlatanova J., et al., 2009, Li G. and Widom J. 2004)。このようなヌクレオソームの一過的な構造変化が、結果として様々な DNA 結合因子群のヌクレオソーム DNA への結合を可能にしていると考えられている。このようなヌクレオソームの構造変化を制御する因子として、ヒストンタンパク質の数が異なるサブヌクレオソームと呼ばれる構造体や、ヒストンバリエント、ヒストン翻訳後修飾、ヒストンシャペロン、リンカーヒストンなどが考えられている。サブヌクレオソームは、H3-H4 四量体からなるテトラソームをはじめとして、ヌクレオソームから H2A-H2B が一分子欠落しているヘキサソーム等が知られている。ヘキサソームについては特に研究が進んでおり、ヌクレオソームから H2A-H2B 二量体が解離すると、H2A-H2B 二量体によって安定化されていた DNA の運動性が大きく向

上し、DNA の opening が起こることが報告されており、様々な DNA 結合タンパク質の結合が促進されると考えられている (Arimura Y., et al., 2012)。近年の研究から、このようなサブヌクレオソームは、転写開始点周辺に形成されていることが明らかにされ、遺伝子の発現制御に重要であることが考えられている (Rhee HS., et al., 2014, Cole HA., et al., 2014) これまでに、このような H2A-H2B 二量体の解離は、ヒストンシャペロンである Nap1 や、FACT により触媒されていることが明らかにされており、これらの因子が転写において重要な機能をもつと考えられている (Levchenko V., et al., 2005, Belotserkovskaya R., et al., 2003, Venkatesh S. and Workman JL., 2015)。また、ヒストンバリエントの中でも、H2A.B や、CENP-A を含むヌクレオソームは、ヌクレオソームの DNA 末端の運動性が高いことが報告されており、DNA の breathing が起きやすいと考えられている (Conde e Silva N., et al., 2007, Tachiwana H., et al., 2011, Arimura Y., et al., 2014, Bao Y., et al., 2004, Doyen CM., et al., 2006)。このようなバリエントを含むヌクレオソームにおいては、高い DNA 末端の運動性のために、リンカーヒストン H1 の結合が抑制されており、その結果として、様々な DNA 結合タンパク質がヌクレオソーム DNA にアクセスできるようになると考えられている (Shukla MS., et al., 2011, Roulland Y., et al., 2016)。ヒストン翻訳後修飾においても、H3 の 56 番目のアセチル化は、ヌクレオソームの DNA 末端の運動性を増大させ、H1 の結合を抑制することで転写因子の結合を促進することが報告されている (Bernier M., et al., 2015)。これらの一連の知見は、様々な要因によりヌクレオソームにおける DNA へのアクセシビリティが制御されており、このような制御機構が生体内における様々な機能発現に重要であることを示している。

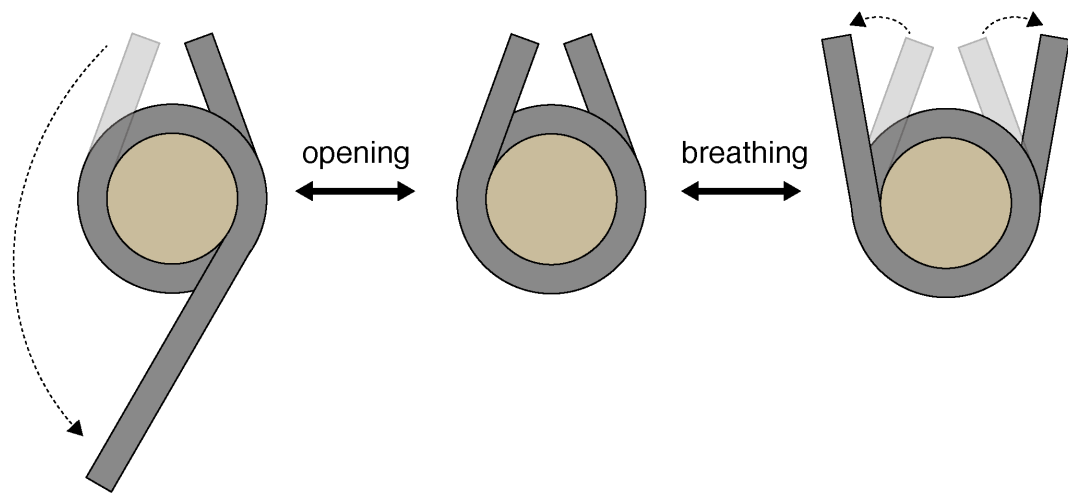


図 5. ヌクレオソームの breathing 及び opening。

breathing 及び opening は、ヌクレオソーム中の DNA と、ヒストンとの相互作用が一過的に崩壊することで生じると考えられている。短い範囲での DNA の解離は breathing、長い範囲での解離は opening を示している (Zlatanova J., et al., 2009)。

1-8 本研究について

真核生物のクロマチン構造の基本単位は、ヌクレオソームであり、ヌクレオソームは、様々な DNA の機能発現を規定している。細胞核内において、H2B は、動的に移動する一方で、H3 はクロマチンに安定に留まることが報告されている (Kimura H. and Cook PR., 2001) このことは、H2A-H2B は、比較的短い期間においてクロマチン構造を制御し、DNA の機能発現に関与するのに対して、H3-H4 は、クロマチンの構造を長期的に規定する因子であることを示唆している。霊長類特異的ヒストン H3 バリエントである H3.Y は、そのアミノ酸配列の相同性から、H3.3 より派生したバリエントと考えられている。H3.Y は、組織特異的な発現パターンを示し、そして、がん組織においても発現していることが明らかにされている (Widemann SM., et al., 2010)。さらに、H3.Y は、ユークロマチンに存在し、転写の活性化に関与することが示唆されている (Widemann SM., et al., 2010)。これらの知見から、H3.Y は霊長類において、特定の組織への分化及びがん化におけるクロマチン構造を規定し、遺伝子の発現制御に関与していると考えられる。しかしながら、H3.Y によるクロマチン構造制御機構は明らかではない。

本研究では、クロマチン構造制御における H3.Y の機能を明らかにすることを目的とした。そのために、H3.Y の精製系を確立し、試験管内において H3.Y を含むヌクレオソームの再構成を行った。H3.Y を含むヌクレオソームの構造的特徴を明らかにするため、再構成したヌクレオソームの立体構造を決定した。立体構造に基づき、H3.Y を含むヌクレオソームの構造生物学的及び生化学的性質の解析を行った。その結果、H3.Y を含むヌクレオソームは、クロマチン上に安定的に形成されること、DNA 末端の運動性が大きく、リンカーヒストン H1 の結合効率が低く、緩んだクロマチンを形成すること

が明らかになった。さらに、生細胞内において H3.Y は大部分が H3.3 との組み合わせのヘテロヌクレオソームを形成していることが示唆されているため、ヘテロヌクレオソームの再構成及び機能解析を行った。その結果、ヘテロヌクレオソームにおいても DNA 末端の運動性と、H1 の結合を抑制する性質が保存されているが明らかになった。これらの結果から、遺伝子発現における H3.Y のクロマチン上での機能について議論した。

第2章 実験方法

2-1 リコンビナントタンパク質の精製

本研究では、H3.Y を含むヌクレオソームの再構成を行い、生化学的、構造生物学的性質についての解析を行った。ヌクレオソームを再構成するために、ヒトヒストンタンパク質をリコンビナントタンパク質として精製した。ヒトヒストンタンパク質 H2A、H2B、H4、H3.3、H3.Y、及び H3.Y の変異体の精製は、先行研究 (Tachiwana H., et al., 2010) を参考に行った。まず、それぞれのヒストンタンパク質をコードする DNA 断片を大腸菌における発現ベクターに挿入した。本コンストラクトにおいて、ヒストンタンパク質は、N 末端にヘキサヒスチジインタグ (His₆ タグ) が付加されたタンパク質として産生される。また、His₆ タグとヒストンタンパク質の間には、スロンビン認識配列 (L-V-P-R-G-S) が挿入されており、スロンビンによって His₆ タグの切除が可能である。His₆ タグを切断した後は、ヒストンタンパク質の N 末端に 4 アミノ酸 (G-S-H-M) が残る。このようにデザインされたそれぞれのヒストンタンパク質を含むプラスミドを用いて、大腸菌を形質転換した。H2A、H2B、H3.3 及び H3.Y については BL21 (DE3) を、H4 については、JM109 (DE3) を形質転換し、アンピシリン (100 µg/mL) を含む LB 寒天プレートにて 37°C にて一晩培養した。プレート上に形成されたコロニーを LB 培地へ移し、37°C にて一晩振盪培養を行った。培養後の大腸菌を遠心により集菌し、溶解 buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 1 mM PMSF, 5% glycerol) にて懸濁後、超音波破碎を行った。破碎後のライセートを遠心分離し、上清画分を捨て、沈殿画分を buffer 1 にて再懸濁を行った。超音波破碎及び遠心分離を 2 回行った後に、沈殿画分を変性 buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 7 M guanidine-HCl, 5%

glycerol) にて懸濁し、超音波破碎の後、4°Cにて一晩ローテートし、沈殿画分を変性した。変性後のサンプルを遠心分離し、上清画分を Ni-NTA アガロースビーズ (Qiagen) と混合し、1 時間 4°Cにてローテートした。遠心分離によりビーズを回収した後、ビーズをエコノカラム (Bio-Rad) に詰めた。ビーズを Ni カラム用洗浄 buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 6 M urea, 5% glycerol, 5 mM imidazole) にて洗浄した後、Ni カラム用洗浄 buffer 及び Ni カラム用溶出 buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 6 M urea, 5% glycerol, 500 mM imidazole) を用いて、imidazole 濃度を 5 mM から 500 mM までの直線勾配にて変化させ、His₆ タグ融合ヒストンタンパク質を溶出した。溶出後のタンパク質を、透析 buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM 2-mercaptoethanol) に 4°Cにて一晩透析した。透析後のサンプルにスロンビンを加え、His₆ タグの切除を行った後に、陽イオン交換カラム Mono S に吸着させた。Mono S カラムを MonoS カラム用洗浄 buffer (20 mM NaOAc, pH 5.2, 200 mM NaCl, 6 M urea, 5 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EDTA) にて洗浄した後、MonoS カラム用洗浄 buffer 及び MonoS カラム用溶出 buffer (20 mM NaOAc, pH 5.2, 200 mM NaCl, 6 M urea, 5 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EDTA) を用いて、NaCl の濃度を 200 mM から 900 mM へ直線勾配にて変化させ、ヒストンタンパク質を溶出した。溶出後のサンプルを 2 mM mercaptoethanol を含む水へ透析し、十分に溶媒の脱塩を行った後に、凍結乾燥を行った。精製されたヒストンのパウダーを 4°Cにて保存した。

生体内において、H3.Y は H3.3 との組み合わせのヘテロヌクレオソームを形成していることが報告されている (Widemann SM., et al., 2010)。そこで、H3.3 及び H3.Y を一分子ずつ含むヘテロヌクレオソームを再構成するために、His₆-SUMO タグ融合 H3.3 (His₆-SUMO-H3.3) を精製した。His₆-SUMO-H3.3 をコードする DNA 断片を *Nde*I

及び *Bam*HI サイトを用いて大腸菌における発現ベクターに挿入した。本コンストラクトにおいて、H3.3 には、N 末端に His₆-SUMO タグが付加されている。His₆-SUMO と H3.3 の間には、プレシジョン認識配列 (L-E-V-L-F-Q) を挿入しており、プレシジョンにより切断が可能となっている。切断後には、H3.3 の N 末端に、(G-P-G-H-M) が残る。本プラスミドを用いて、BL21 (DE3) 株にて His₆-SUMO-H3.3 を発現させた。His₆-SUMO-H3.3 の精製は、先行研究 (Arimura Y., et al., 2014) に従って行った。

リンカーヒストン H1 は、クロマチンを凝縮させることが知られている。H3.Y を含むヌクレオソームに対する H1 の結合効率を評価するため、H1 の精製を行った。ヒトリンカーヒストン H1.2 について、H1.2 をコードする DNA をプラスミドに挿入した。本コンストラクトにおいて、リンカーヒストン H1.2 は、C 末端に SUMO-His₆ タグが付加されたタンパク質として産生される。H1.2 と SUMO-His₆ の間には、プレシジョン認識配列 (L-E-V-L-F-Q) が挿入されており、プレシジョンプロテアーゼによりタグの切断が可能である。タグの切断後には、C 末端に (L-E-V-L-F-Q) が残る。本プラスミドを用いて、BL21 (DE3) codon plus RIL 株を形質転換させ、H1.2-SUMO-His₆ を産生させた。精製は、先行研究 (Machida S., et al., 2014) に従って行った。

ヌクレオソームに適切に H1 を結合させるヒストンシャペロンとして Nap1 が知られている (Saeki H., et al., 2005, Shintomi K., et al., 2005)。H3.Y を含むヌクレオソームに対する H1 の結合効率の評価試験を行うために、Nap1 の精製を行った。ヒト Nap1 については、*Nde*I 及び *Bam*HI サイトを用いて、大腸菌における発現ベクターに挿入した。本コンストラクトにおいて、Nap1 は、N 末端に His₆ タグが付加されたタンパク質として産生される。His₆ タグと Nap1 の間には、プレシジョン認識配列を挿入しており、プレシジョンによりタグの切断が可能である。本プラスミドを用いて、大腸菌

Rosseta-gami B (DE3) 株にて、IPTG を用いて His₆-Nap1 を発現させた。精製は、先行研究 (Tachiwana H., et al., 2008) に従って行った。

2-2 ヌクレオソーム及びテトラソームの再構成

H3.Y を含むヌクレオソームの機能解析を行うため、ヌクレオソームの再構成を行った。再構成には、146 塩基対の α -satellite DNA 断片 (Luger K., et al., 1997) 及び、193 塩基対の 601 配列の DNA 断片 (Lowary PT. and Widom J., 1998, Arimura Y., et al., 2012) を用いた。これらの DNA は、ヒストン八量体に効率よく巻き付き、ヌクレオソームを形成しやすいことが知られている (Luger K., et al., 1997, Lowary PT. and Widom J., 1998)。これらの DNA の精製は、それぞれ (Dyer PN., et al., 2004, Arimura Y., et al., 2012) に従って行った。ヌクレオソームの再構成では、まず、H2A、H2B、H3 及び H4 のパウダーを等モル比分量り取り、ヒストン溶解 buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 7 M guanidine-HCl, 20 mM 2-mercaptoethanol) に溶解させた。溶液を 4°C にて 1.5 時間緩やかに混合した後、2 M NaCl を含む巻き戻し buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 M NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol) に 4 回透析を行った。ヒストン八量体をゲル濾過カラムクロマトグラフィー Superdex 200 にて精製し、-80°C にて保存した。H3.Y を含むヌクレオソームの再構成は、ヒストン八量体と、146 塩基対 または 193 塩基対の DNA を混合し、塩透析法によって行った。H3.3 及び、H3.Y の変異体を含むヌクレオソーム再構成も同様の方法によって行った。再構成されたヌクレオソームを、分取用電気泳動装置 Prep Cell を使用し、非変性 6% アクリルアミドゲルを用いて精製した。

次に、テトラソームの構造安定性を解析するために、テトラソームの再構成を行った。まず、H3 と H4 のパウダーを等モル比分量り取り、ヒストン溶解 buffer に溶解させた。4°Cにて 1.5 時間緩やかに混合した後、2 M NaCl を含む巻き戻し buffer に透析し、その後 NaCl の濃度を 1 M、0.5 M、0.1 M と段階的に低下させた。再構成された H3-H4 複合体を、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー Superdex 200 を用いて精製した。テトラソームの再構成は、精製した H3-H4 複合体と、146 塩基対の DNA を混合し、塩透析法により行った。再構成されたテトラソームは、DNA 上において様々なポジショニングとなっているため、安定にテトラソームを形成するポジショニングに再配置するために、55°Cにて 2 時間熱処理を行った。その後、分取用電気泳動装置 Prep Cell を使用し、非変性 6%アクリルアミドゲルを用いて電気泳動により精製を行った。

H3.Y 及び H3.3 を含むヘテロヌクレオソームの再構成は、(Arimura Y., et al., 2014) を参考に行った。まず、H2A、H2B、His₆-SUMO-H3.3、H3.Y 及び H4 を混合し、上述の様にヒストン八量体を再構成及び、精製した。精製後のサンプルには、H3.Y を二分子含むヒストン八量体、一分子の H3.Y 及び一分子の His₆-SUMO-H3.3 を含むヒストン八量体、及び His₆-SUMO-H3.3 を二分子含むヒストン八量体が含まれる。3 種類のヒストン八量体を含むサンプルと、146 塩基対または 193 塩基対の DNA を混合し、塩透析法によって、ヌクレオソームを再構成した。再構成されたヌクレオソームを分取用電気泳動装置 Prep Cell を使用し、非変性 6%アクリルアミドゲルを用いて電気泳動により精製を行い、H3.Y 及び His₆-SUMO-H3.3 を含むヘテロヌクレオソームのみを精製した。精製後、プレジジョンプロテアーゼにより、His₆-SUMO-H3.3 中の His₆-SUMO タグを切断し、H3.Y/H3.3 ヘテロヌクレオソームを再度非変性ゲルを用いて電気泳動により精製した。

2-3 H3.Y を含むヌクレオソームの結晶化及び構造決定

H3.Y を含むヌクレオソームの立体構造を決定するために、X 線結晶構造解析を行った。結晶化を行うために、精製した H3.Y を含むヌクレオソームを 2.5 mg/mL となるように濃縮を行った。H3.Y ヌクレオソームと、レザーバー液 (100 mM NaOAc (pH4.6), 140 mM MnCl₂, 12% 2-propanol, 6% trimethylamine N-oxide dihydrate) を等液量ずつ混合し、ハンギングドロップ蒸気拡散法にて結晶化を行い、20°C にて静置した。得られた結晶を、4°C にてクライオプロテクト液 ((100 mM NaOAc (pH4.6), 140 mM MnCl₂, 30% PEG400, 2% trehalose) に移し、140 K の N₂ ガスを用いて瞬時に凍結した。

H3.Y を含む結晶の回折データセットを Photon Factory (高エネルギー加速器研究機構) の BL-17A ビームライン及び、SPring-8 BL41XU ビームラインにて取得した。データセットの指数付け及びスケーリングは、HKL2000 ソフトウェア (Otwinowski Z. and Minor W., 1997) を用いて行った。位相決定は、Phaser プログラム (McCoy AJ., et al., 2007) を用いて、H3.3 を含むヌクレオソーム構造 (PDB code : 3AV2) をモデルとして、分子置換法により行った。構造モデルの精密化は、PHENIX プログラムを用いて行った。初回の精密化は、rigid body について行い、その後、xyz coordinates、real-space、occupancies、individual B-factors について精密化を行った。手動での構造モデルの組み立てを COOT ソフトウェア (Emsley P. and Cowtan K., 2004) を用いて行った。最終構造について MolProbity プログラム (Chen VB., et al., 2010) により評価を行い、Ramachandran outliers を含まないことを確認した (表 2)。構造に関するすべての図は、PyMOL (Schrodinger; <http://www.pymol.org>) を用いて作製した。

2-4 マイクロコッカルヌクレアーゼアッセイ

H3.Y を含むヌクレオソームの DNA 末端のマイクロコッカルヌクレアーゼに対する感受性を解析するために、マイクロコッカルヌクレアーゼアッセイを行った。1.4 μg の DNA を含む 146 塩基対または 193 塩基対を含むヌクレオソームを、それぞれ 0.7 または 1.4 ユニットのマイクロコッカルヌクレアーゼ (Takara) 存在下の反応溶液 (42 mM Tris-HCl (pH8.0) , 15 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1.8 mM DTT) にて反応させた。反応は、70 μL にて行い、一定時間ごとに 10 μL ずつ回収し、15 μL の除タンパク液 (0.5 mg/ml proteinase K (Roche) , 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) , 80 mM EDTA, 0.25% SDS) を加え、反応を停止させた。反応産物を非変性 6%アクリルアミドゲル電気泳動にて展開し、EtBr により染色を行った。ランニング緩衝液として、0.2x TBE 溶液を用いた。146 塩基対の DNA を含むヌクレオソームのマイクロコッカルヌクレアーゼアッセイでは、LAS-4000 (GE healthcare) にて電気泳動結果を撮影した後、未消化の 146 塩基対のバンドを MultiGauge ver. 3.2 (Fujifilm) を用いて定量化した。

2-5 リンカーヒストン H1 結合アッセイ及び H1-ヌクレオソーム

複合体のマイクロコッカルヌクレアーゼアッセイ

H3.Y を含むヌクレオソームのリンカーヒストン H1 に対する結合効率を評価するために、H1 の結合アッセイを行った。様々な濃度の H1 を、193 塩基対の DNA を含むヌクレオソーム (0.1 μM) と、Nap1 (0.3 μM) 存在下において、反応溶液 (35 mM Tris-HCl (pH 8.0) , 70 mM NaCl, 0.01 mM PMSF, 0.05 mM EDTA, 5% glycerol, 1.2 mM DTT, 1.1 mM 2-mercaptoethanol and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA) 中で、30 分間、37°Cにて反応さ

せた。反応産物を非変性 5%アクリルアミドゲル電気泳動により展開した。電気泳動では、1x TBE (90 mM Tris-base, 90 mM ホウ酸、 2 mM EDTA) をランニング緩衝液として用いた。電気泳動後のゲルを EtBr により染色し、LAS-4000 (GE healthcare) によりゲルを撮影した。ヌクレオソーム及び、H1-ヌクレオソーム複合体のバンドを MultiGauge ver. 3.2 (Fujifilm) を用いて定量化し、H1-ヌクレオソーム複合体の形成効率を算出した。

H1 とヌクレオソームの複合体に巻きつけている DNA の長さを明らかにするために、マイクロコッカルヌクレアーゼにより複合体の DNA を消化し、保護される DNA の長さを解析した。H1-ヌクレオソーム複合体のマイクロコッカルヌクレアーゼアッセイでは、30 μ L の H1-ヌクレオソーム複合体に、2.5 mM CaCl_2 存在下でマイクロコッカルヌクレアーゼ (1.05 ユニット) を反応させ、45 μ L の液量にて反応を行った。反応後、一定時間ごとに反応液 10 μ L を分取し、10 μ L の除タンパク液 (0.5 mg/ml proteinase K (Roche)、 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、80 mM EDTA、0.25% SDS) を加え、反応を停止させた。除タンパク後の反応産物をフェノールクロロホルム・イソアミルアルコール処理し DNA を抽出した後、エタノール沈殿により DNA を回収し、非変性 6%ポリアクリルアミドゲルにて展開した。電気泳動のランニング緩衝液として、0.2x TBE を用いた。電気泳動後のゲルを、EtBr により染色し、LAS-4000 (GE healthcare) を用いて撮影した。

2-6 ヒドロキシラジカルフットプリントアッセイ

H1 とヌクレオソームの複合体において、ヒストンタンパク質と DNA が相互作用し

ている部位を明らかにするために、ヒドロキシラジカルフットプリントアッセイを行った。ヒドロキシラジカルフットプリントアッセイを行うために、DNA 末端に Cy5 を導入したヌクレオソームの再構成を行った。まず、193 塩基対の DNA をアルカリフォスファターゼ (Takara) により、DNA 末端の脱リン酸化を行った後、*HinfI* (Takara) により、DNA を切断した。反応後に生成された 164 塩基対の DNA を TSK gel DEAE 5-5PW (TOSOH) を用いて精製した。精製した 164 塩基対の DNA に 5' 端に Cy5 を付加した 29 塩基対の合成オリゴヌクレオチドをライゲーションした。このように作製した 193 塩基対 Cy5 DNA を用いて、塩透析法によりヌクレオソームの再構成を行い、Prep Cell を用いて非変性ゲルを用いて電気泳動により精製を行った。

ヒドロキシラジカルフットプリントアッセイは、(Syed SH., et al., 2010, Ranjan A., et al., 2015) を参考に、改良を加えたプロトコルにて行った。Nap1 (1.5 μ M) 存在下において、H1.2 (0.9 μ M) とヌクレオソーム (0.5 μ M) を 60 μ L の反応液にて、37°C において 30 分間反応させた。反応後、Amicon Ultra 30 kDa 遠心濃縮管 (Millipore) を用いて、溶媒を quencher free buffer (5 mM Tris-HCl (pH7.5)、5 mM NaCl、0.25 mM EDTA) へ置換した。ヒドロキシラジカルフットプリントアッセイでは、1.5 μ g の DNA を含む H1-nucleosome complex 50 μ L を 1.5 mL チューブの底に置き、チューブの側面に 2.5 μ L の 4 mM $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ /8 mM EDTA、2.5 μ L の 0.1 M アスコルビン酸及び、2.5 μ L の 0.6% (v/v) の過酸化水素水を置き、遠心によって各反応試薬を混合し、反応を開始させた。2 分間の反応後、5 μ L の 100 mM チオウレア、10 μ L の 3 M 酢酸ナトリウムを加えることで反応を停止し、フェノールクロロホルム・イソアミルアルコール処理により除タンパク後、グリコーゲン存在下でエタノール沈殿を行い、反応後の DNA を回収した。回収した DNA を、8% ポリアクリルアミドウレア変性ゲ

ルを用いて電気泳動を行い、展開した。泳動後、Cy5 の蛍光シグナルを Typhoon 9410 (GE healthcare) を用いてガラス越しに撮影した。

2-7 熱安定性アッセイ

H3.Y を含むヌクレオソームの熱安定性を評価するために、熱安定性アッセイを行った。熱安定性アッセイは、(Taguchi H., et al., 2014) を参考に行った。ヌクレオソーム (野生型 H3.Y、野生型 H3.3、H3.Y (K42R)、H3.3 (R42K)、H3.Y (M124I) 及び H3.3 (I124M)) については、4.5 µg の DNA を含むヌクレオソームを用いて熱耐性アッセイを行った。また、H3.Y の様々なドメインの変異体を含むテトラソーム (H3.Y (10–35^{H3.3})、H3.Y (K42R)、H3.Y (L62I)、H3.Y (77–80^{H3.3}) 及び H3.Y (124–135^{H3.3})) については 2.25 µg、C 末端のアミノ酸の変異体を含むテトラソーム (H3.Y (M124I)、H3.Y (L130I)、H3.Y (R132G) 及び H3.Y (G134R)) については 4.5 µg の DNA を含むテトラソームを用いて熱耐性試験を行った。熱耐性試験は、20 µL の 20 mM Tris-HCl (pH7.5)、5x SYPRO Orange、1 mM DTT、100 mM NaCl を含む反応液において行った。StepOnePlus™ リアルタイム PCR 機 (Applied Biosystems) を用いて、SYPRO Orange の蛍光シグナルを検出した。リアルタイム PCR 機は、26°C から 95°C まで、1 分間に 1°C ずつ上昇するよう設定した。さらに、以下の式のように正規化を行った。 $F(T)_{\text{normalized}} = [F(T) - F(26)] / [F(95) - F(26)]$. $F(T)$ は、T°C のときの蛍光シグナル強度を示す。

2-8 ポリヌクレオソームの再構成

H3.Y を含むポリヌクレオソームの形態を評価するために、ポリヌクレオソームの再構成を行った。ポリヌクレオソームを再構成するために、208 塩基対の 601 配列 (Lowary PT. and Widom J., 1998) が 12 回繰り返し配列となっている DNA を (Dorigo B., et al., 2003) を参考に精製した。まず、*EcoRV* により目的の DNA をプラスミドから切り出し、PEG を加えることで沈殿、精製を行い、さらにエタノール沈殿を行い精製した。このように精製した DNA と、ヒストン八量体を用いて、塩透析法によりポリヌクレオソームの再構成を行った。再構成したポリヌクレオソームを、Prep Cell 分取用電気泳動装置を使用し、0.7%アガロース 2%ポリアクリルアミドコンポジットゲルを用いて電気泳動により精製した。0.7%アガロース 2%アクリルアミドコンポジットゲルは、SeaKem GTG アガロース (LONZA) 及びアクリルアミド/ビス (29:1) (ナカライテスク) を用いて作製した。電気泳動におけるランニング緩衝液には、0.2x TBE を用いた。ポリヌクレオソームにおいて、ヌクレオソームの再構成成功率を *ScaI* (Takara) により評価した。*ScaI* は、ポリヌクレオソーム中のヌクレオソームと隣のヌクレオソームの間に位置している (図 9)。100 µg の DNA を含む精製後のポリヌクレオソームを、10 µL の反応液 (10 mM Tris-HCl (pH7.5) , 50 mM NaCl, 0.5 mM MgCl₂, 0.1 mg/mL BSA) において、*ScaI* を 12 時間、22°Cにて反応させた。反応産物を、5%ポリアクリルアミドゲルにより展開し、EtBr により染色を行った。電気泳動におけるランニング緩衝液には、1x TBE を用いた。電気泳動後にゲルを LAS-4000 (GE healthcare) により撮影した。

2-9 分析超遠心による沈降速度解析

H3.Y を含むポリヌクレオソームの形態を評価するために、分析超遠心による沈降速度解析を行った。ポリヌクレオソーム (260 nm の吸光度が 0.6-0.8 の濃度) を、10 mM Tris-HCl (pH7.5) または、10 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 mM MgCl₂ に透析し、溶媒の置換を行った。沈降速度法解析は、ProteomeLab XL-I (Beckman Coulter) 及び、8 穴の An-50Ti ローターを用いて行った。沈降速度解析を行う前に、サンプルを分析超遠心機中で 20°C にて 2 時間静置し、温度を一定にした。沈降速度測定は、22,000 rpm にて行い、260 nm のスキャンを収集した。収集したデータセットについて、UltraScanII 9.9 revision 1927 (Demeler, <http://www.ultrascan.uthscsa.edu>) を用いて、enhanced van Hilde-Weischet 法 (Demeler B. and van Holde KE., 2004) により解析を行った。ポリヌクレオソームの偏比容を 0.65 mL/g とし、溶媒の密度と粘性率をサンプルの溶媒に合わせ、沈降係数 $S_{20,w}$ の算出を行った。

第3章 結果

3-1 序

H3.Y は、霊長類特異的なヒストン H3 バリエントであり、H3.1 と比較して 30 アミノ酸、H3.3 と比較して、26 アミノ酸異なる（図 3）。ヒストンタンパク質は、生物種間においても高度に保存されているタンパク質であり、1 アミノ酸の置換が大きな意味を持つ可能性が考えられている（Maze L., et al., 2014）。そのため主要型ヒストンと比較して 30 アミノ酸の置換が起きている H3.Y は、主要型ヒストンとは異なる機能を持つ可能性が考えられる。H3.Y と最も相同性の高いヒストン H3 バリエントは、H3.3 である。興味深いことに、H3.Y と H3.3 は、ヒストンタンパク質をクロマチンに取り込みまたは取り出しを行うヒストンシャペロンにより認識される部位（A87、I89、G90）が保存されている。H3.3 の A87、I89、G90 は、ヒストンシャペロン DAXX や HIRA の認識部位の一部であることが報告されている（Drané P., et al., 2010, Elsässer SJ., et al., 2012, Ricketts MD., et al., 2015）。この事実から、H3.Y は、H3.3 より派生したヒストン H3 バリエントであることが考えられ、その機能差異は霊長類が進化の過程において獲得したクロマチン制御機構を暗示している。先行研究によって、H3.Y は、ユークロマチンに存在し、ロックダウンにより様々な遺伝子の転写が抑制されることが明らかになっている（Wiedemann SM., et al., 2010）。本知見より、H3.Y は転写の活性化に関与している可能性が示唆されるが、H3.Y によるクロマチン構造制御については未だ明らかになっていない。そこで、本研究では、H3.Y を含むヌクレオソームを再構成し、その構造及び機能解析を行った。特に、H3.3 との機能差異について焦点を当てた。

3-2 H3.Y を含むヌクレオソームの再構成及び構造解析

H3.Y の機能解析を行うために、H3.Y を含むヌクレオソームの再構成を行った。そこでまず、ヒトヒストン H2A、H2B、H3.Y、H4 をリコンビナントタンパク質として精製した (図 6A)。精製したヒストンを用いてヒストン八量体を再構成し、さらに 146 塩基対の α -satellite DNA を混合し、塩透析法により H3.Y を含むヌクレオソームの再構成を行った。その結果、H3.Y を含むヌクレオソームが形成された (図 6 B, C)。再構成したヌクレオソームを用いて結晶化を行い、得られた結晶について大型放射光施設 SPring-8 及び Photon Factory (高エネルギー加速器研究機構) にて X 線回折実験を行い、データセットを取得した。得られたデータについて構造解析を行った結果、H3.Y を含むヌクレオソームの結晶構造を 2.8 Å の分解能において決定することに成功した (図 7A)。構造解析における統計値を表 2 に示す。結晶構造から、H3.Y を含むヌクレオソームの全体構造は、主要型ヒストン H3.1 や、H3.Y の H3.3 を含むヌクレオソームに非常に類似していることが明らかになった (Tachiwana H., et al., 2011)。H3.Y を含むヌクレオソーム構造において、H3.Y の特異的なアミノ酸をマッピングした結果を図 7 に示す。興味深いことに、ヌクレオソームの DNA 末端付近に位置する部位に、H3.Y 特異的な四つのアミノ酸 (K42、L46、K53、Q59) が存在していることが明らかになった (図 7B)。これまでに、ヌクレオソームの DNA 末端がヌクレオソームから一過的に解離するというヌクレオソーム breathing モデルが提唱されている (Zlatanova J., et al., 2009)。ヌクレオソームの DNA 末端がヒストンコアから一過的に解離することが、転写因子等を始めとする DNA 結合タンパク質の DNA へのアクセシビリティを増加させることから、遺伝子の発現制御等に重要であることが考えられている。ヌクレオソーム

DNA 末端近傍に位置する H3.Y 特異的な四つのアミノ酸の中でも、特に 42 番目のアミノ酸について、H3.3 のアルギニンが DNA と水素結合を生じるのに対して、H3.Y のリジンは水素結合を生じない (図 7C)。そのため、H3.Y を含むヌクレオソームでは、H3.3 を含むヌクレオソームと比較して、ヌクレオソーム DNA の運動性が高い可能性が考えられた。また、115 番目、122 番目のアミノ酸には、H3.3 はリジンであるのに対して、H3.Y はアルギニンとなっている (図 3)。H3.Y の R115, R122 はともに DNA のリン酸骨格に直接相互作用している可能性が示唆された (図 7D, E)。これまでに、主要型 H3 の K115, K122 は水を介して DNA に結合していることが知られていることから (Davey CA., et al., 2002)、H3.Y は、H3.3 とは異なる機構で DNA と相互作用している可能性が考えられた。これらの結果から、H3.Y を含むヌクレオソームは、H3.3 を含むヌクレオソームと比較して、ヌクレオソーム構造上における様々な部位においてヒストン-DNA 相互作用が異なる可能性が示唆された。

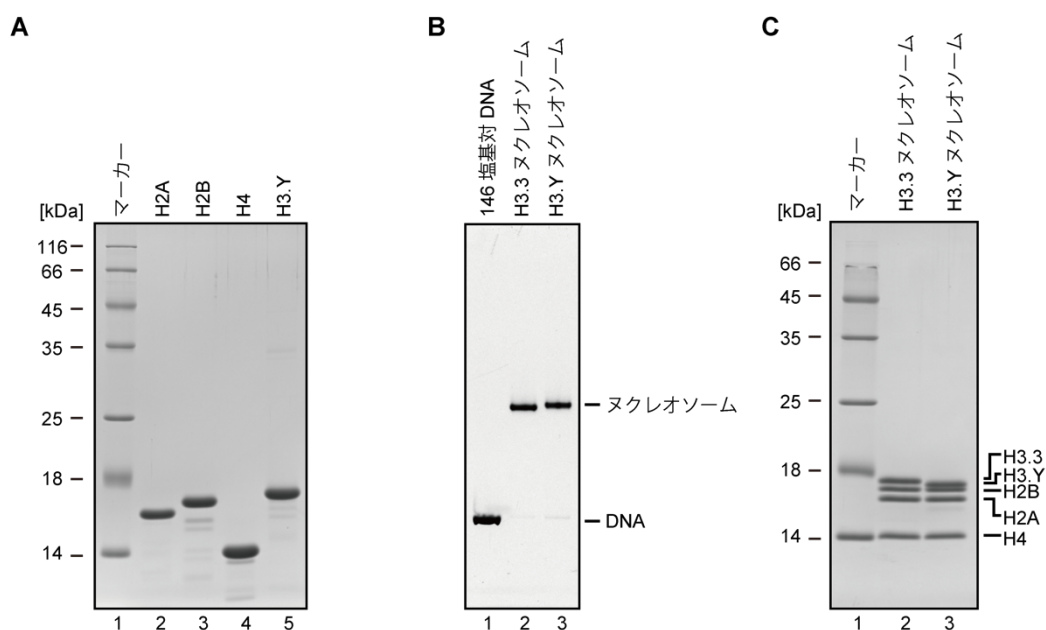


図 6. H3.Y を含むヌクレオソームの再構成。

(A) 精製したヒストンタンパク質を SDS-PAGE により展開し、CBB 染色を行った。(Kujirai T., et al., 2016, Supplementary Fig. S1A より引用、改変) (B) 精製した H3.3 または H3.Y を含むヌクレオソームを非変性 PAGE により展開し、EtBr により染色を行った。(Kujirai T., et al., 2016, Supplementary Fig. S1B より引用、改変) (C) 精製した H3.3 または H3.Y を含むヌクレオソームを SDS-PAGE により展開し、CBB 染色を行った。(Kujirai T., et al., 2016, Supplementary Fig. S1C より引用、改変)

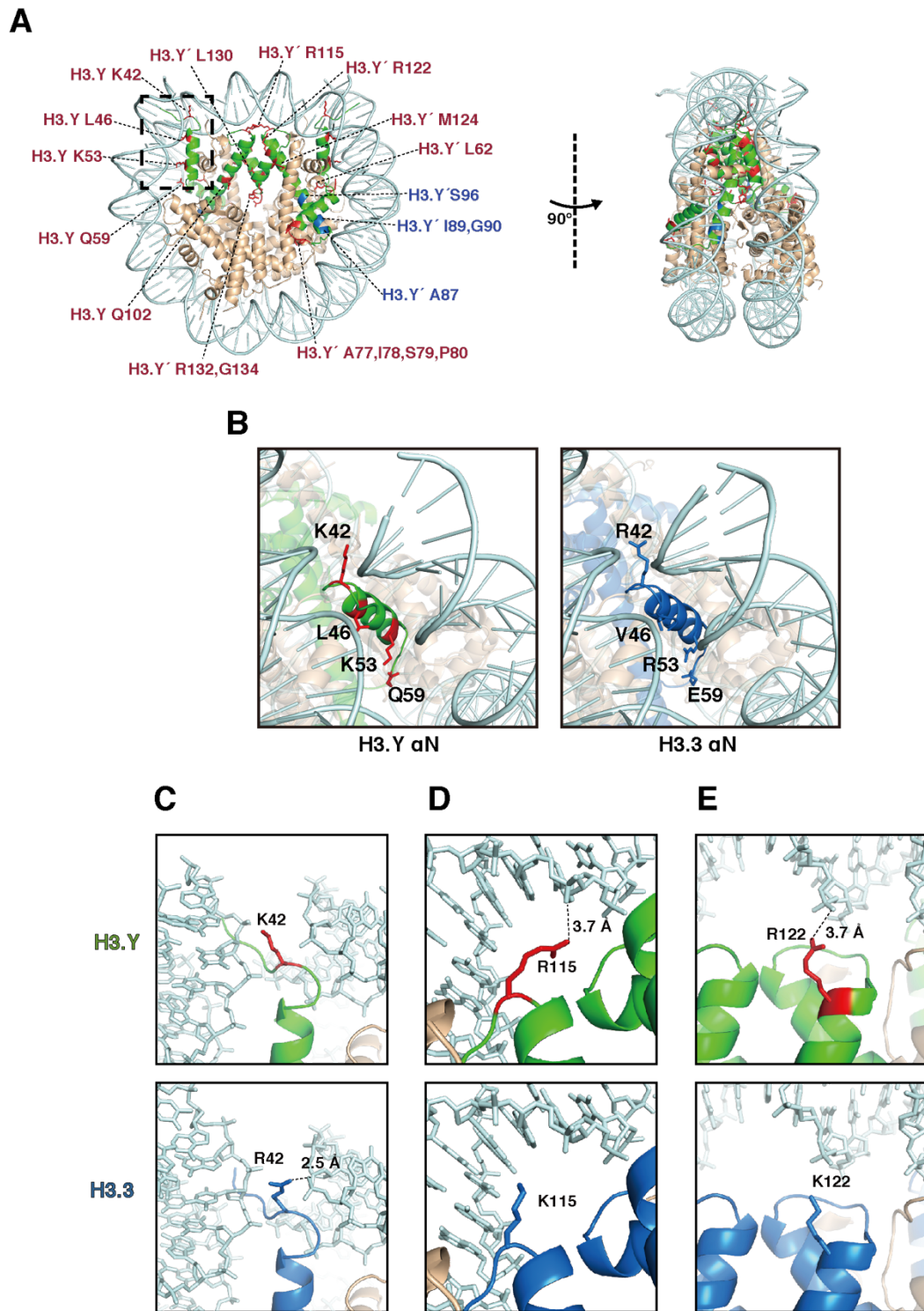


図 7. H3.Y を含むヌクレオソームの立体構造

(A) H3.Y を含むヌクレオソームの結晶構造 (PDB code : 5AY8)。構造中において、H3.Y 特異的なアミノ酸は赤色に、H3.Y と H3.3 は緑色に色付けされている。特に H3.1

と比較して H3.3 特異的なアミノ酸は青色で示した。(B) H3.Y または H3.3 を含むヌクレオソームの DNA 末端付近の拡大図。パネル A の点線により囲まれた領域を拡大した。H3.Y に特異的な K42、L46、K53、Q59 が α N ヘリックスに位置している。(H3.3 ヌクレオソームの構造 PDB code : 3AV2) (C、D、E) H3.Y に特異的な K42、R115、R122 (H3.3 では、R42、K115、K122) の周辺構造の拡大図。点線は、距離を示す。

表 2. データ収集と精密化における統計情報

H3.Y nucleosome	
Data collection	
Space group	$P2_1 2_1 2_1$
Cell dimensions	
	$a = 101.522$
a, b, c (Å)	$b = 101.922$
	$c = 175.736$
α, β, γ (°)	$\alpha = \beta = \gamma = 90$
Resolution (Å)	50.00 - 2.80 (2.90 - 2.80)
Reflections (Unique)	43676
R -merge (%)	9.6 (43.4)
Mean $\langle I/\sigma(I) \rangle$	11.0 (2.0)
Completeness (%)	95.5 (92.8)
Redundancy	4.2 (3.1)
Refinement	
Resolution (Å)	48.945 - 2.800
R -factor/free R -factor (%)	20.12 / 24.88
R.m.s deviations	
bond length (Å)	0.011
bond angles (°)	1.301
B factors(Å ²)	
Protein	47.18
DNA	92.33
Ion	85.15
Solvent	50.84
Ramachandran plot	
residues in favorable resions (%)	97.80
residues in allowed regions (%)	2.20
PDB code	5AY8

括弧の中の値は、最外殻分解能における情報を示す。MolProbity により構造の評価を行い、Ramachandran outliers を含まないことを確認した。

3-3 H3.Y を含むヌクレオソームのマイクロコッカルヌクレアーゼに対する感受性解析

ヌクレオソームの DNA 末端の運動性は、核内タンパク質の DNA へのアクセシビリティを制御する重要な性質である。H3.Y を含むヌクレオソームの結晶構造より、H3.Y を含むヌクレオソームでは、H3.3 を含むヌクレオソームと比較して、ヌクレオソームの DNA 末端の運動性が異なる可能性が示唆された。そこで、H3.Y を含むヌクレオソームにおける DNA 末端のマイクロコッカルヌクレアーゼに対する感受性を試験した (図 8A)。マイクロコッカルヌクレアーゼは、ヒストンから解離している DNA 領域を優先的に切断する性質を持つ。マイクロコッカルヌクレアーゼによる消化効率が高いことは、DNA のヒストンコアから解離する頻度が高く、DNA の運動性が大きいことを示している。146 塩基対の α -satellite 配列の DNA を用いて、H3.Y を含むヌクレオソーム及び H3.3 を含むヌクレオソームを再構成し、マイクロコッカルヌクレアーゼアッセイを行った (図 8B)。未消化の 146 塩基対 DNA に着目すると、H3.Y を含むヌクレオソームでは、H3.3 を含むヌクレオソームと比較して、146 塩基対の DNA が消化される効率が高いことが明らかになった。この結果から、H3.Y を含むヌクレオソームは、H3.3 を含むヌクレオソームと比較して、DNA 末端のマイクロコッカルヌクレアーゼの感受性が高いことが明らかになった。本結果は、H3.Y を含むヌクレオソームの DNA 末端の運動性が大きいことを示唆していると考えられる。また、146 塩基対の α -satellite 配列とは異なる配列、長さの DNA においても、同様の性質が見られるかどうかを評価するため、193 塩基対の 601 配列の DNA を用いて、H3.Y を含むヌクレオソーム及び H3.3 を含むヌクレオソームを再構成し、マイクロコッカルヌクレアーゼアッ

セイを行った (図 8C)。その結果、異なる DNA を含む場合においても、H3.Y を含むヌクレオソームでは H3.3 を含むヌクレオソームと比較して、マイクロコッカルヌクレアーゼに対する感受性が高いことが明らかになった。これらの結果から、H3.Y を含むヌクレオソームの DNA 末端のマイクロコッカルヌクレアーゼに対する感受性はヒストンに巻きついている DNA の配列や長さに依存しないことが明らかになった。本結果から、H3.Y の性質によりヌクレオソームの DNA 末端の運動性が大きいことが示唆された。

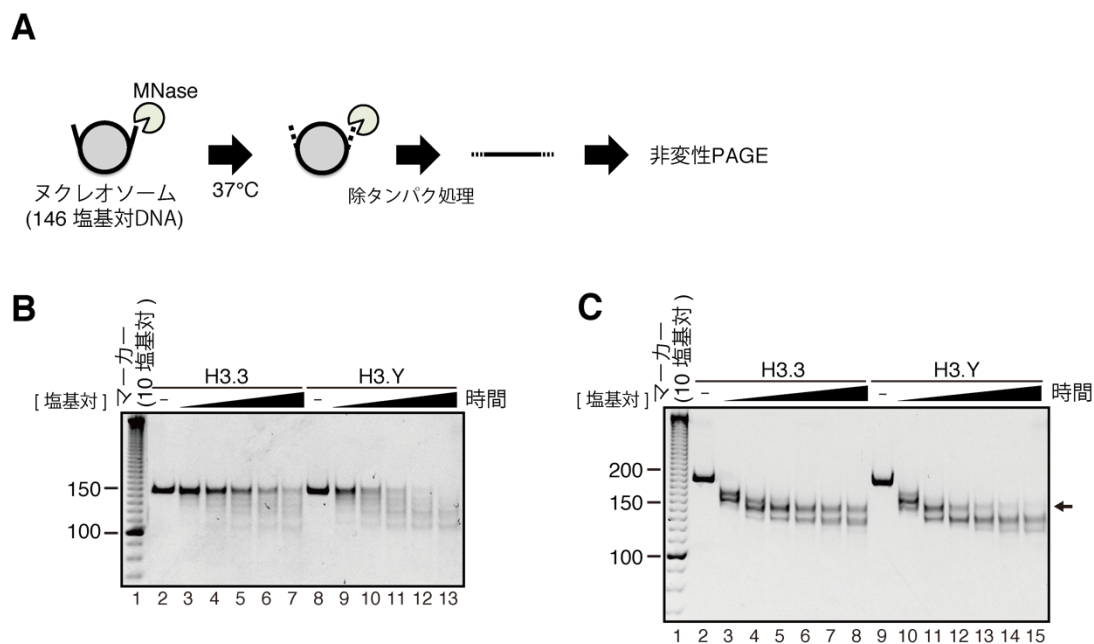


図 8. H3.Y を含むヌクレオソームのマイクロコッカススクレアーゼ感受性解析。

(A) マイクロコッカススクレアーゼアッセイの概念図。(Kujirai T., et al., 2016, Fig. 2A より引用、改変) (B) マイクロコッカススクレアーゼアッセイ。146 塩基対の DNA (α -satellite 配列) を含む、H3.3 (レーン 2-7) または H3.Y (レーン 8-13) ヌクレオソームをマイクロコッカススクレアーゼにより 0、3、6、9、12 及び 15 分間反応させた。反応後のサンプルを除タンパク処理した後、非変性 PAGE により展開し、EtBr により染色した。(Kujirai T., et al., 2016, Fig. 2B より引用、改変) (C) 193 塩基対の DNA (Widom 601 配列) を含む、H3.3 (レーン 2-8) または H3.Y (レーン 9-15) ヌクレオソームをマイクロコッカススクレアーゼにより 0、3、6、9、12、15 及び 18 分間反応させた。反応後のサンプルを除タンパク処理した後、非変性 PAGE により展開し、EtBr により染色した。矢印は、150 塩基対程度のバンドを示す。(Kujirai T., et al., 2016, Fig. 2D より引用、改変)

3-4 H3.Y を含むポリヌクレオソームの形態解析

第3章3節より、H3.Yを含むヌクレオソームでは、ヌクレオソームのDNA末端の運動性が大きいことが示された。ヌクレオソームのDNA末端は、ヌクレオソームが連なったポリヌクレオソームの高次構造に影響を与える可能性が考えられる。そこで、H3.Yがクロマチン高次構造に与える影響を解析するため、H3.Yを含むポリヌクレオソームを再構成し、分析超遠心法を用いた沈降速度解析によりポリヌクレオソームの形態を解析した。沈降速度解析では、分析超遠心法において、粒子が沈降する速度を計測し、沈降係数を算出する。沈降係数が大きい程、ポリヌクレオソームが小さな構造体になっていることを示しており、ポリヌクレオソームが凝縮していることを意味している。まず、208塩基対の601配列DNAが12回連なるDNAを用いて、H3.Yを含むポリヌクレオソーム及びH3.3を含むポリヌクレオソームの再構成を行った(図9A,B)。ポリヌクレオソームの再構成成功率を明らかにするために、*ScaI*アッセイを行った(図9C)。*ScaI*認識部位は、ヌクレオソームの間のリンカーDNA領域に位置しており、消化後に非変性ポリアクリルアミド電気泳動を行うことで、ヌクレオソームが形成されていないDNA領域の有無を評価することができる。H3.Yを含むポリヌクレオソーム及びH3.3を含むポリヌクレオソームのどちらにおいても、フリーDNAがほぼ存在していないことから、ポリヌクレオソームが効率良く再構成されていることが明らかになった。このように調製したポリヌクレオソームを用いて、沈降速度法により形態解析を行った(図9D)。H3.3を含むヌクレオソームでは、27-30Sの沈降係数を示し、先行研究において報告されている主要型のヌクレオソームと同程度の沈降係数を示した(Hansen JC., Lohr D., 1993, Fan JY., et al., 2002)。一方で、興味深いことに、H3.Yを含むポリヌク

レオソームでは、24-26Sを示し、H3.3を含むポリヌクレオソームよりも小さい沈降係数を示した。この結果から、H3.Yは緩んだ形態のポリヌクレオソームを形成することが明らかになった。さらに、これまでに、ポリヌクレオソームは Mg^{2+} の存在下において、凝縮したコンパクトな構造を取ることが報告されているため(Schwarz PM., Hansen JC. et al., 1994)、生理的条件である1 mM Mg^{2+} 存在下においても沈降速度解析を行った。その結果、H3.3を含むポリヌクレオソーム及びH3.Yを含むポリヌクレオソームのどちらも沈降係数が増加し、コンパクトな凝縮した構造が形成された(図9E)。重要なこととして、 Mg^{2+} 存在下においても、H3.Yを含むポリヌクレオソームは、H3.3を含むポリヌクレオソームよりも小さい沈降係数を示した。本結果から、H3.Yを含むポリヌクレオソームでは、H3.3を含むポリヌクレオソームよりも緩んだ形態となることが明らかになった。

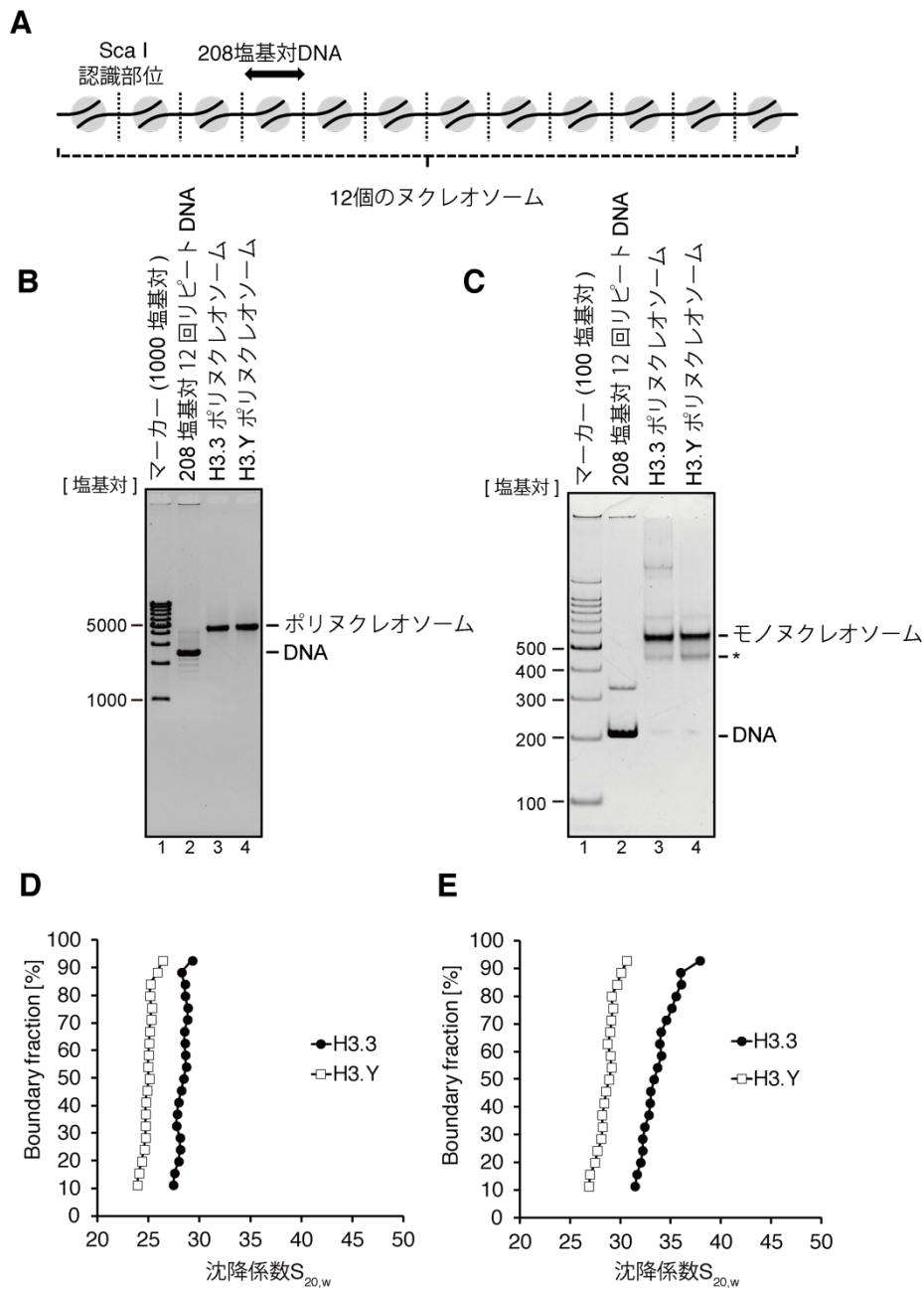


図 9. H3.Y 含むクロマチンの形態解析。

(A) ポリヌクレオソームの構造。(Kujirai T., et al., 2016, Fig. 3A より引用、改変) (B) 精製した DNA (レーン 2)、H3.3 (レーン 3) または H3.Y (レーン 4) を含むポリヌクレオソームをアガロースゲルにて電気泳動を行った。レーン 1 は 1000 塩基対 DNA ラダーマーカーを示す。(Kujirai T., et al., 2016, Supplementary Fig. S3A より引用、改変) (C) ポリヌクレオソームの再構成成功率。DNA (レーン 1)、H3.3 (レーン 3) または

H3.Y (レーン 4) を含むポリヌクレオソームを *ScaI* 存在下で反応させた。反応後、サンプルを非変性 PAGE により展開し、EtBr 染色を行った。アスタリスクは、ヘキサソームを示す。(Kujirai T., et al., 2016, Supplementary Fig. S3B より引用、改変) (D、E) H3.Y または H3.3 を含むポリヌクレオソームの 1 mM マグネシウムイオン非存在下 (D) または存在下 (E) における分析法遠心法による沈降速度解析。沈降係数の分布を enhanced van Holde-Weichet 法により解析した。(Kujirai T., et al., 2016, Fig. 3B、3C より引用、改変) 縦軸は Boundary fraction を示しており、横軸は、沈降係数 $S_{20,w}$ を示している。沈降係数 $S_{20,w}$ は、値が小さいほど緩んだクロマチンを、大きいほど凝縮したクロマチンを示している。Boundary fraction は、特定の沈降係数をとる分子が全体に占める割合を示している。

3-5 リンカーヒストン H1 結合解析

リンカーヒストン H1 は、ヌクレオソームに結合し、クロマチンの高次構造を形成する。これまでに、リンカーヒストン H1 は、ヌクレオソームのダイアド領域の DNA 領域と、リンカー DNA に結合することが明らかにされてきた (Bednar J., et al., 2017, Zhou BR., et al., 2015,) (図 4)。本研究の結果から、H3.Y を含むヌクレオソームでは、DNA 末端の運動性が大きいことが示唆された。ヌクレオソーム DNA 末端の運動性が大きいことによってリンカーヒストン H1 の結合に影響を与える可能性が考えられた。そこで、193 塩基対の DNA を含む H3.Y ヌクレオソーム及び H3.3 を含むヌクレオソームを再構成し、Nap1 存在下における H1 のヌクレオソームへの結合をゲルシフトアッセイにより評価した (図 10A)。Nap1 は、リンカーヒストン H1 をクロマチンに取り込みや取り出し担う因子である (Saeki H., et al., 2005, Shintomi K., et al., 2005)。実験は、標準的な塩濃度の条件下 (35 mM Tris-HCl, 70 mM NaCl, 0.01 mM PMSF, 0.05 mM EDTA, 5% glycerol, 1.2 mM dithiothreitol, 2-mercaptoethanol and 5 µg/ ml BSA) にて行った (図 10B)。その結果、H3.3 を含むヌクレオソームに対して、H3.Y を含むヌクレオソームでは、H1 の結合が顕著に抑制されることが明らかになった。実際に、H1 の濃度が 0.9 µM のときに、H3.3 を含むヌクレオソームでは 65%、H3.Y を含むヌクレオソームでは、25%の結合効率となっている (図 10C)。また、実験を行う中で、低い塩濃度の条件下 (5 mM Tris-HCl, 5 mM NaCl and 0.25 mM EDTA) においては、H3.Y ヌクレオソーム及び H3.3 を含むヌクレオソームのどちらにおいても H1 の結合効率が向上することを発見した (図 11A, B)。さらに、この条件では H1 の H3.Y を含むヌクレオソームと H3.3 を含むヌクレオソームに対する結合効率の差が小さくなった (図 10C、図

11B)。そこで、H3.Yを含むヌクレオソームに対するH1の結合様式を明らかにするために、低塩濃度条件下においてヒドロキシラジカルフットプリントアッセイを行った。ヒドロキシラジカルフットプリントアッセイでは、タンパク質が結合しているDNA領域を検出することができる。ヒドロキシラジカルは、DNAのリン酸骨格を切断するが、タンパク質が結合している領域においては切断が阻害される。このような原理によって、タンパク質結合部位を明らかにすることができる。フットプリントアッセイの結果、H1非存在下では、H3.3を含むヌクレオソーム及びH3.Yを含むヌクレオソームともに10塩基ごとにDNAが保護されることが明らかになった(図11C)。ヌクレオソーム構造において、DNAはヒストンと10塩基ごとに相互作用することから、H3.3を含むヌクレオソーム及びH3.Yを含むヌクレオソームは、溶液中においてヌクレオソーム構造をとっていることが確認された。さらにH1存在下において、H3.Yを含むヌクレオソームでは、H3.3を含むヌクレオソームと同様に、ダイアド領域のDNAがヒドロキシラジカルによる切断から保護されることが明らかになった(図11C)。さらに、H1とH3.Yを含むヌクレオソームの複合体を再構成し、マイクロコッカルヌクレアーゼによる消化実験を行った結果、クロマトソームに相当する160-170塩基対程度の長さのDNAが保護されることが明らかになった(図11D)。本結果は、先行研究におけるクロマトソームのマイクロコッカルヌクレアーゼによる消化実験において保護されるDNAの長さと一致している(Simpson RT., 1978)。これらの結果から、H1はH3.Yを含むヌクレオソームにリンカーDNAとダイアドに特異的に結合するものの、H3.Yを含むヌクレオソームに対する結合効率が低いことが明らかになった。

H3.Yを含むヌクレオソームにおいて、H1の結合が抑制されるメカニズムを明らかにするために、H3.Yについて変異体解析を行った。第3章2節に示したように、H3.Y

ヌクレオソームの DNA 末端付近には四つの H3.Y 特異的なアミノ酸が位置しており、中でも 42 番目のリジンが DNA 末端の運動性に重要な役割を果たしていることが考えられた。そこで、H3.Y 及び H3.3 の相互置換変異体である H3.Y K42R 変異体ヒストン:H3.Y(K42R)を含むヌクレオソーム及び H3.3 R42K 変異体ヒストン:H3.3(R42K)を含むヌクレオソームを再構成し、H1 の結合実験を行った (図 12A, B)。結合実験は、標準の塩濃度の条件下において行った。その結果、H3.3 (R42K) を含むヌクレオソームは、野生型 H3.3 を含むヌクレオソームに対して、H1 の結合効率が低下することが明らかになった。また一方で、H3.Y (K42R) を含むヌクレオソームは、野生型 H3.Y を含むヌクレオソームに対して、結合効率が向上することが明らかになった。本結果から、H3.Y を含むヌクレオソームに対して H1 の結合効率が低い性質は、H3.Y 特異的 K42 によるものであることが明らかになった。しかし、H3.Y (K42R) を含むヌクレオソームの H1 の結合効率は、野生型 H3.3 を含むヌクレオソームの効率に相当するものではなく部分的な効果であるため、L46、K53、Q59 などの他の H3.Y 特異的なアミノ酸が H1 の結合効率の低下に関与している可能性が考えられる。

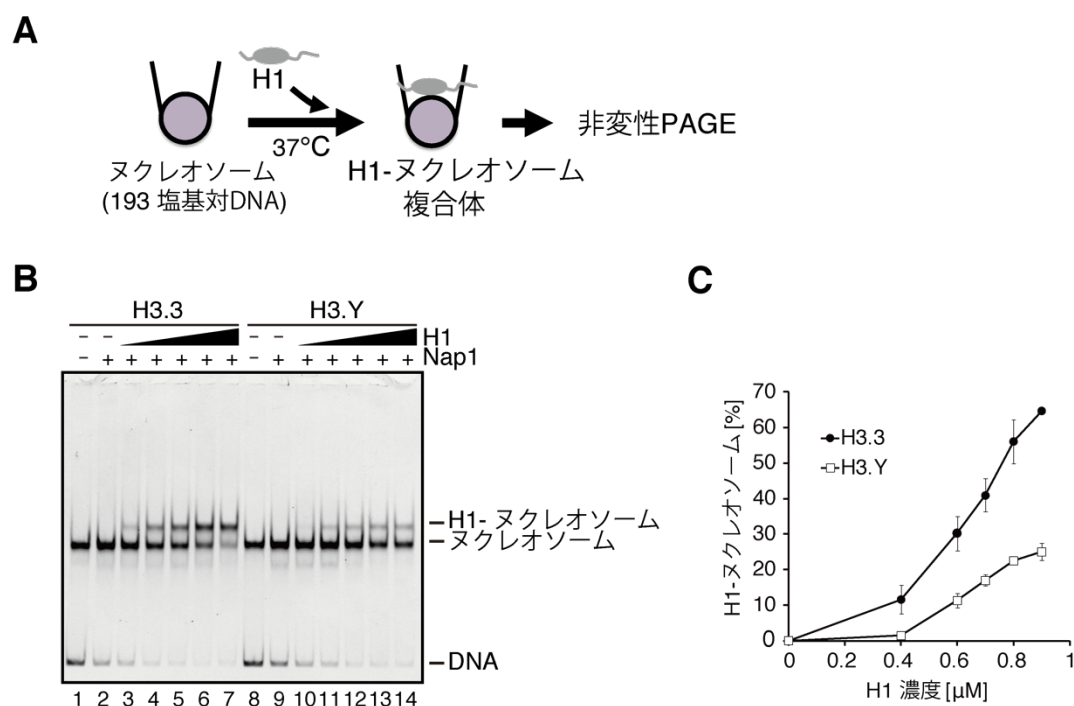


図 10. H3.Y を含むヌクレオソームの H1 結合解析。

(A) H1 結合アッセイの概念図。Kujirai T., et al., 2016, Fig. 4A より引用、改変) (B) 様々な量の H1 (0 μM : レーン 1, 2, 8 及び 9; 0.4 μM : レーン 3 及び 10; 0.6 μM : レーン 4 及び 11; 0.7 μM : レーン 5 及び 12; 0.8 μM : レーン 6 及び 13; 0.9 μM : レーン 7 及び 14) と H3.3 (レーン 1-7) または H3.Y (レーン 8-14) を含むヌクレオソーム (0.1 μM) を Nap1 (0.3 μM) 存在下で、混合し反応させた。反応後、非変性 PAGE にて展開し、EtBr により染色を行った。(Kujirai T., et al., 2016, Fig. 4B より引用、改変) (C) H1 結合アッセイの定量結果。H1 とヌクレオソーム複合体及びヌクレオソームのバンドを定量し、H1 とヌクレオソーム複合体の形成効率を算出した。実験を 3 回行い、平均値をプロットし、エラーバーとして標準偏差を示した。Kujirai T., et al., 2016, Fig. 4C より引用、改変)

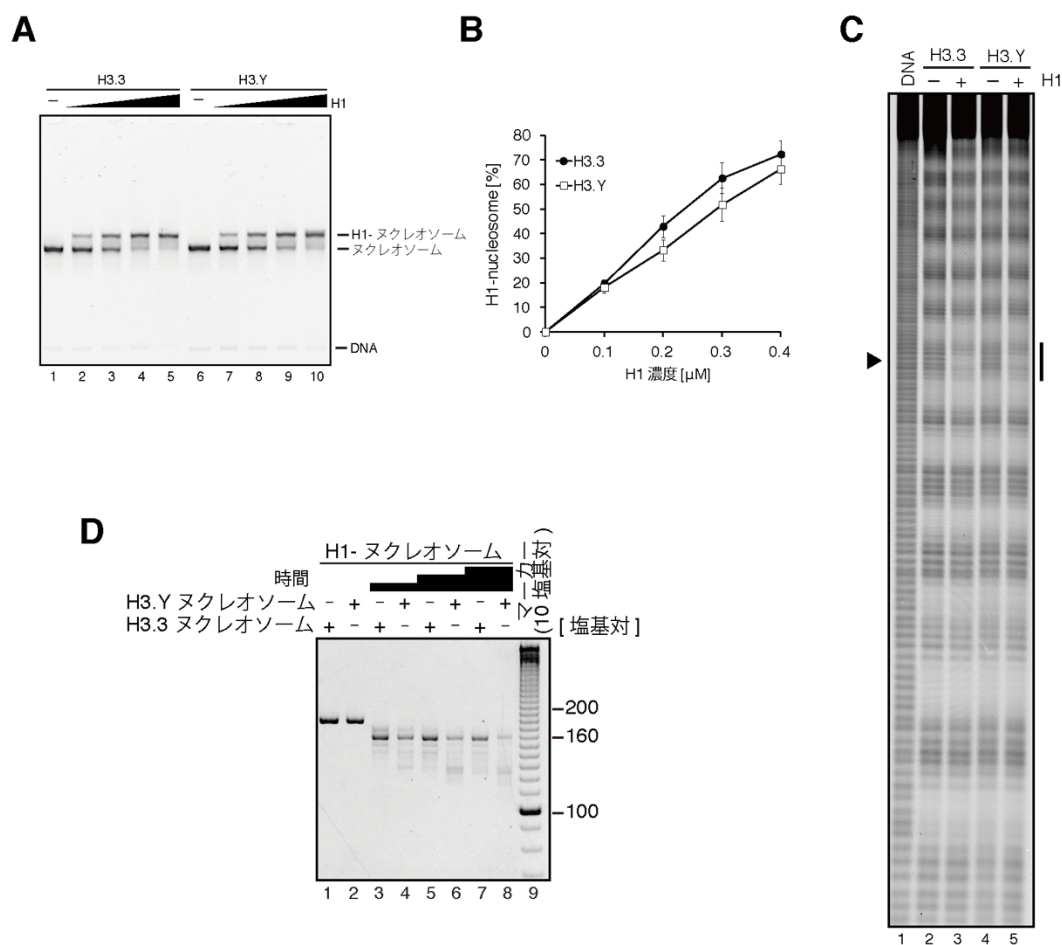


図 11. H3.Y を含むヌクレオソームの H1 結合様式についての解析。

(A) 低塩濃度下における H1 結合アッセイ。Cy5 付加されている 193 塩基対の DNA を含む H3.Y ヌクレオソームまたは H3.3 を含むヌクレオソームを再構成した。H1 (0 μM: レーン 1 及び 6; 0.2 μM: レーン 2 及び 7; 0.3 μM: レーン 3 及び 8; 0.4 μM: レーン 4 及び 9; 0.4 μM: レーン 5 及び 10) と H3.3 (レーン 1-5) ヌクレオソームまたは H3.Y (レーン 6-10) ヌクレオソーム (0.1 μM) を Nap1 (0.3 μM) 存在下で、低塩濃度 (5 mM Tris-HCl, 5 mM NaCl, 0.25 mM EDTA) の条件にて混合し、反応させた。反応後、非変性 PAGE にて展開し、EtBr により染色を行った。(Kujirai T., et al., 2016, Supplementary Fig. S6A より引用、改変) (B) 低塩濃度における H1 結合アッセイの定量結果。H1 とヌクレオソーム複合体及びヌクレオソームのバンドを定量し、H1 とヌクレオソーム複合体の形成効率を算出した。実験を 3 回行い、平均値をプロットし、エラーバーとして標準偏差を示した。(Kujirai T., et al., 2016, Supplementary Fig. S4B より引用、改変) (C) H1 とヌクレオソーム複合体のハイドロキシルラジカルフッ

トプリントアッセイ。レーン 1 は、DNA をハイドロキシルラジカルにより切断したときのコントロールを示す。H3.3 ヌクレオソーム（レーン 2-3）または H3.Y を含むヌクレオソーム（レーン 4-5）を H1 存在下（レーン 3、5）または非存在下（レーン 2、4）において、ハイドロキシルラジカルにより DNA を切断した。サンプルを除タンパク後に変性 PAGE により展開した。右側の矢印と左側のバーはそれぞれ、ヌクレオソームのダイアドと、H1 によるフットプリントを示す。（Kujirai T., et al., 2016, Fig. 4D より引用、改変）(D) H1 とヌクレオソーム複合体のマイクロコッカルヌクレアーゼアッセイ。H1 と H3.3 ヌクレオソーム複合体（形成効率 77%、レーン 1、3、5 及び 7）または H1 と H3.Y ヌクレオソーム複合体（形成効率 49%、レーン 2、4、6 及び 8）をマイクロコッカルヌクレアーゼにより処理した（0 分：レーン 1-2；3 分：レーン 3-4；6 分：レーン 5-6；9 分：レーン 7-8）。レーン 9 は 10 塩基対 DNA ラダーマーカを示す。（Kujirai T., et al., 2016, Fig. 4E より引用、改変）

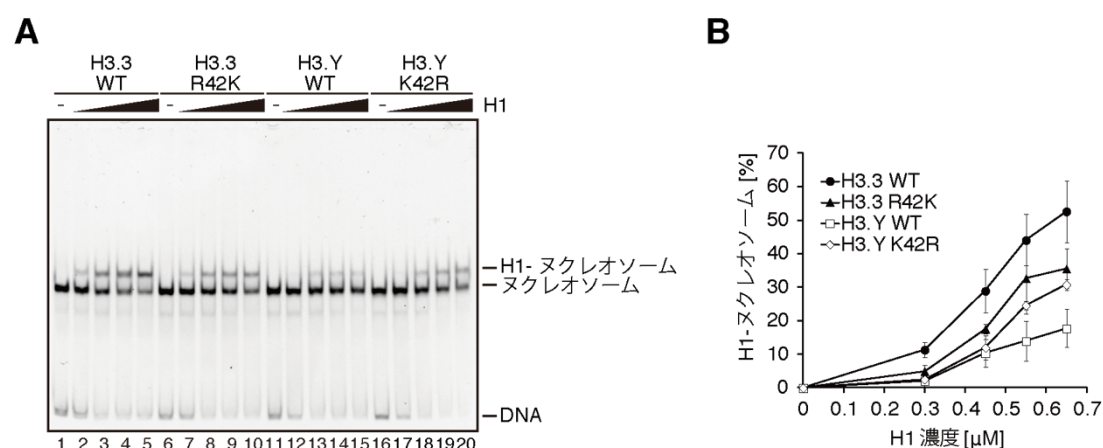


図 12. 42 番目のアミノ酸の変異体を含むヌクレオソームの H1 結合解析。

(A) 様々な量の H1 (0 μM : レーン 1, 6, 11 及び 16; 0.3 μM : レーン 2, 7, 12 及び 17; 0.45 μM : レーン 3, 8, 13 及び 18; 0.55 μM : レーン 4, 9, 14 及び 19; 0.65 μM : レーン 5, 10, 15 及び 20) と 193 塩基対の DNA を含む野生型 H3.3 (レーン 1-5)、H3.3 (R42K) (レーン 6-10)、野生型 H3.Y (レーン 11-15)、H3.Y (K42R) (レーン 16-20) ヌクレオソームを Nap1 (0.3 μM) 存在下で混合し反応させた。反応後、サンプルを非変性 PAGE により展開し、EtBr 染色を行った。(Kujirai T., et al., 2016, Fig. 4F より引用、改変) (B) 42 番目のアミノ酸の変異体を含むヌクレオソームの H1 結合アッセイの定量結果。H1 とヌクレオソームの複合体のバンド及びヌクレオソームのバンドを定量し、H1 とヌクレオソームの複合体の形成効率を算出し、平均値をプロットした。エラーバーは標準偏差を示す ($n=3$)。(Kujirai T., et al., 2016, Fig. 4G より引用、改変)

3-6 H3.Y を含むヌクレオソームの構造安定性解析

これまでの解析から、H3.Y を含むヌクレオソームは DNA 末端の運動性が大きいことが明らかにしてきた。この運動性は、ヌクレオソーム構造の安定性に寄与している可能性が考えられる。そこで、H3.Y を含むヌクレオソームの構造安定性を評価するため、熱安定性アッセイを行った (図 13A)。熱安定性アッセイでは、ヌクレオソームに蛍光物質である SYPRO orange を混合し、温度を上昇させた際に発する蛍光シグナルを計測する。SYPRO orange は、タンパク質の疎水性面に結合した際に蛍光を発する性質を持つため、温度の上昇に伴いヌクレオソームが崩壊し露出した疎水性アミノ酸に結合し蛍光を発する。これまでの先行研究から熱安定性アッセイにおいて、主要型のヌクレオソームは 2 段階の反応を経て崩壊することが明らかにされている (Taguchi H., et al., 2014)。一段階目にあたる反応では、ヌクレオソームから H2A-H2B 二量体が解離し、二段階目にあたる反応は、DNA から H3-H4 四量体が解離する過程である。本結果から、H3.Y を含むヌクレオソームでは、H3.3 を含むヌクレオソームと比較して、H2A-H2B 二量体が低い温度において解離することが明らかになった (図 13B)。T_m 値は、H3.3 を含むヌクレオソームにおいては、一段階目にあたる H2A-H2B 二量体がヌクレオソームから解離する反応は 69-70°C 付近である一方で、H3.Y を含むヌクレオソームにおいては、一段階目の反応は 68-69°C 付近である。さらに、H3.Y-H4 四量体の構造安定性について詳細に解析を行うために、H3.Y-H4 テトラソーム及び H3.3-H4 テトラソームを再構成し、熱安定性アッセイを行った (図 13C)。その結果、H3.Y-H4 テトラソームは、H3.3-H4 テトラソームと比較して、高い熱安定性を示すことが明らかになった。T_m 値は、H3.3-H4 テトラソームは、84-85°C 付近である一方で、H3.Y-H4 テトラ

ソームは 86-87°C 付近である。H3.Y-H4 テトラソームの安定性が高いという性質は、クロマチンに安定的に留まるために重要な性質であると考えられるため、次に、H3.Y-H4 テトラソームの安定性に重要なアミノ酸の探索を行った。まず、H3.Y の 10-35 番目のアミノ酸を H3.3 の相当するアミノ酸に置換した変異体ヒストン：H3.Y (10-35^{H3.3})、H3.Y K42R 変異を含むヒストン：H3.Y (K42R)、H3.Y L62I 変異を含むヒストン：H3.Y (L62I)、H3.Y の 77-80 番目のアミノ酸を H3.3 の相当するアミノ酸に置換した変異体ヒストン：H3.Y (77-80^{H3.3})、H3.Y の 124-135 番目のアミノ酸を H3.3 に相当するアミノ酸に置換した変異体ヒストン：H3.Y (124-135^{H3.3}) を精製し、テトラソームの再構成を行い、熱安定性アッセイを行った。その結果を図 14 に示す。実験の結果、H3.Y (77-80^{H3.3}) (T_m 値：85-86°C) 及び H3.Y (124-135^{H3.3}) (T_m 値：81-82°C) を含むヌクレオソームでは、野生型 H3.Y を含むテトラソーム (T_m 値：86-87°C) と比較して安定性が低下したことが明らかになった。中でも、H3.Y (124-135^{H3.3}) 変異体では、安定性が顕著に低下しているため、124-135 番目のアミノ酸領域が H3.Y-H4 テトラソームの安定性に重要な役割を果たしていることが考えられた。そこで、重要なアミノ酸を一アミノ酸単位で明らかにするために、H3.Y(M124I)、H3.Y(L130I)、H3.Y(R132G)、H3.Y (G134R) 変異体を含むテトラソームを再構成し、熱安定性アッセイを行った (図 15)。その結果、H3.Y (M124I) (T_m 値：84-85°C) 及び H3.Y (G134R) (T_m 値：85-86°C) を含むテトラソームでは、野生型 H3.Y を含むテトラソーム (T_m 値：86-87°C) と比較して安定性が低いことが明らかになった。中でも、H3.Y (M124I) 変異体では、顕著に熱安定性が低下しているため、124 番目のメチオニンが H3.Y を含むテトラソームの安定性に最も重要であることが明らかになった。さらに、H3.Y (M124I) を含むヌクレオソーム及び、H3.3 (I124M) を含むヌクレオソームを再構成し、熱安定性アッセ

イを行った (図 16A, B) その結果、H3.Y (M124I) 変異体を含むヌクレオソームでは、一段階目の H2A-H2B 二量体が解離する反応の温度には変化が無いものの、二段階目の H3-H4 が DNA より解離する反応については、より低い温度で起こることが明らかになった。一方で、H3.3 (I124M) 変異体を含む変異体では、野生型 H3.3 を含むヌクレオソームと比較して、一段階目の反応に変化はない一方で、二段階目の反応が高い温度で起こることが明らかになった。この結果から、H3.Y 特異的 124 番目のメチオニンが H3.Y を含むヌクレオソーム及びテトラソームの安定性に重要な役割を果たしていることが明らかになった。そこで、124 番目のアミノ酸の周辺構造について、H3.Y を含むヌクレオソームと、H3.3 を含むヌクレオソームの立体構造比較を行った (図 17)。H3.Y 124 番目のメチオニンは、H4 の 50 番目のイソロイシン、54 番目のスレオニン、及び 57 番目のバリンの近傍に位置し、疎水性コアを形成している可能性が考えられた。H3.3 の 124 番目のイソロイシンについても疎水性コアを形成していることから、H3.Y-H4 と H3.3-H4 の疎水性コアのわずかな構造の差異がヌクレオソームの安定性に重要である可能性が考えられる。

前節より、H3.Y 特異的 42 番目のリジンは、DNA 末端の運動性に関与していることが明らかになった。そこで、H3.Y (K42R) を含むヌクレオソーム及び H3.3 (R42K) を含むヌクレオソームを再構成し、熱安定性アッセイを行った (図 16C, D)。その結果、H3.Y (K42R) を含むヌクレオソームは野生型 H3.Y を含むヌクレオソームと同程度の温度において反応が起こり、また、H3.3 (R42K) を含むヌクレオソームについても野生型 H3.3 を含むヌクレオソームと同程度の温度にて反応が起こることが明らかになった。つまり、H3.Y 特異的 42 番目のリジンは、ヌクレオソームの DNA 末端の運動性に関与するものの、ヌクレオソームの安定性に対しては大きな影響を与えないことが示唆

された。

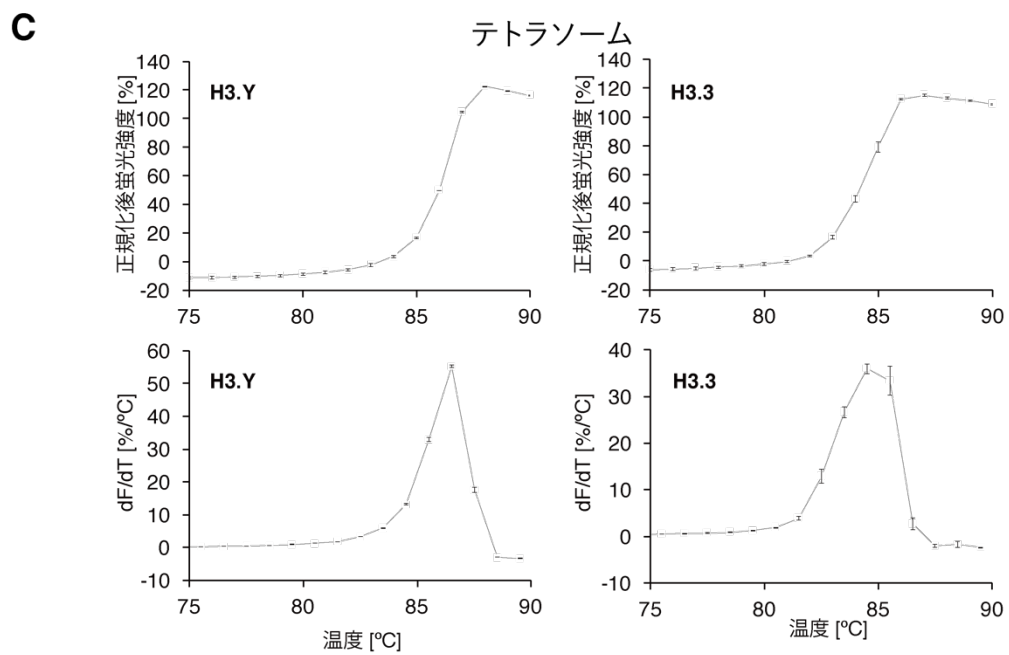
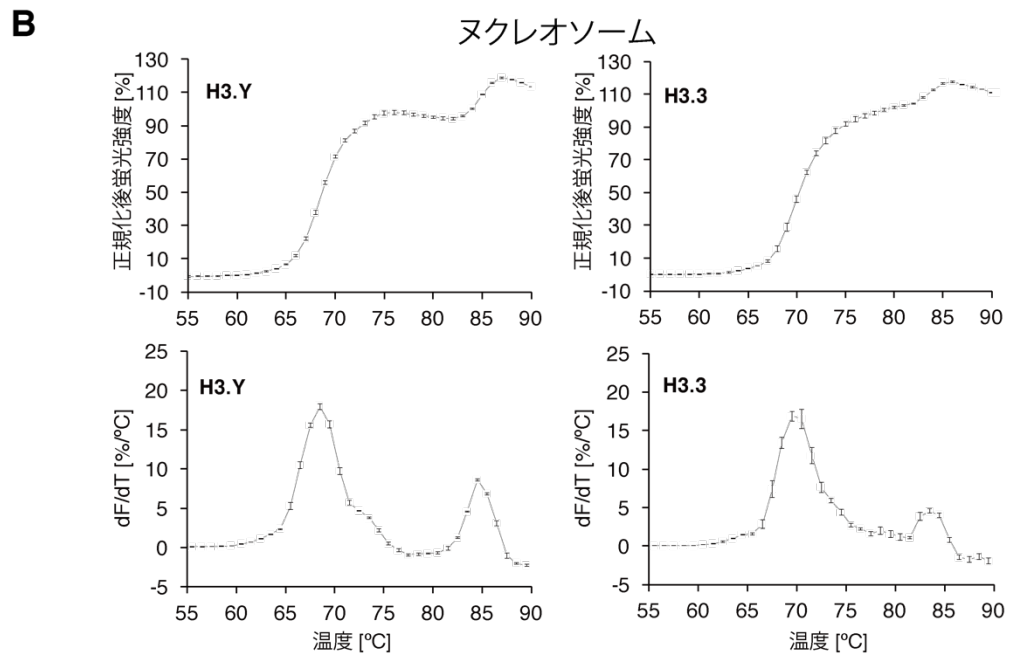
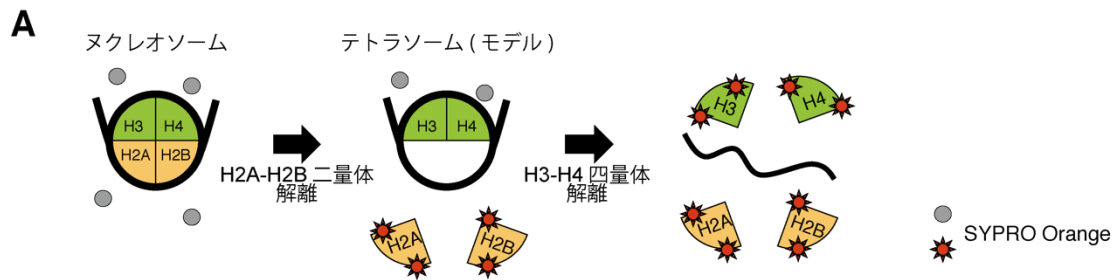


図 13. H3.Y を含むヌクレオソーム及びテトラソームの熱安定性アッセイ。

(A) 熱安定アッセイの概念図。(Kujirai T., et al., 2016, Fig. 6A より引用、改変) (B) H3.Y を含むヌクレオソーム及び H3.3 を含むヌクレオソームの温度上昇に伴う崩壊における正規化後の蛍光強度を示した (上図)。微分プロットを下図に示す。実験を 3 回行い、平均値と標準偏差を図に示した。温度上昇に伴う最初のピークは H2A-H2B 二量体のヌクレオソームからの解離を示し、次のピークは H3-H4 四量体が DNA から解離する反応を示している。(Kujirai T., et al., 2016, Fig. 6C より引用、改変) (C) H3.Y-H4 テトラソーム及び H3.3-H4 テトラソームの崩壊における正規化後の蛍光強度を示した (上図)。微分プロットを下図に示す。実験を 3 回行い、平均値と標準偏差を図に示した。(Kujirai T., et al., 2016, Fig. 6B より引用、改変)

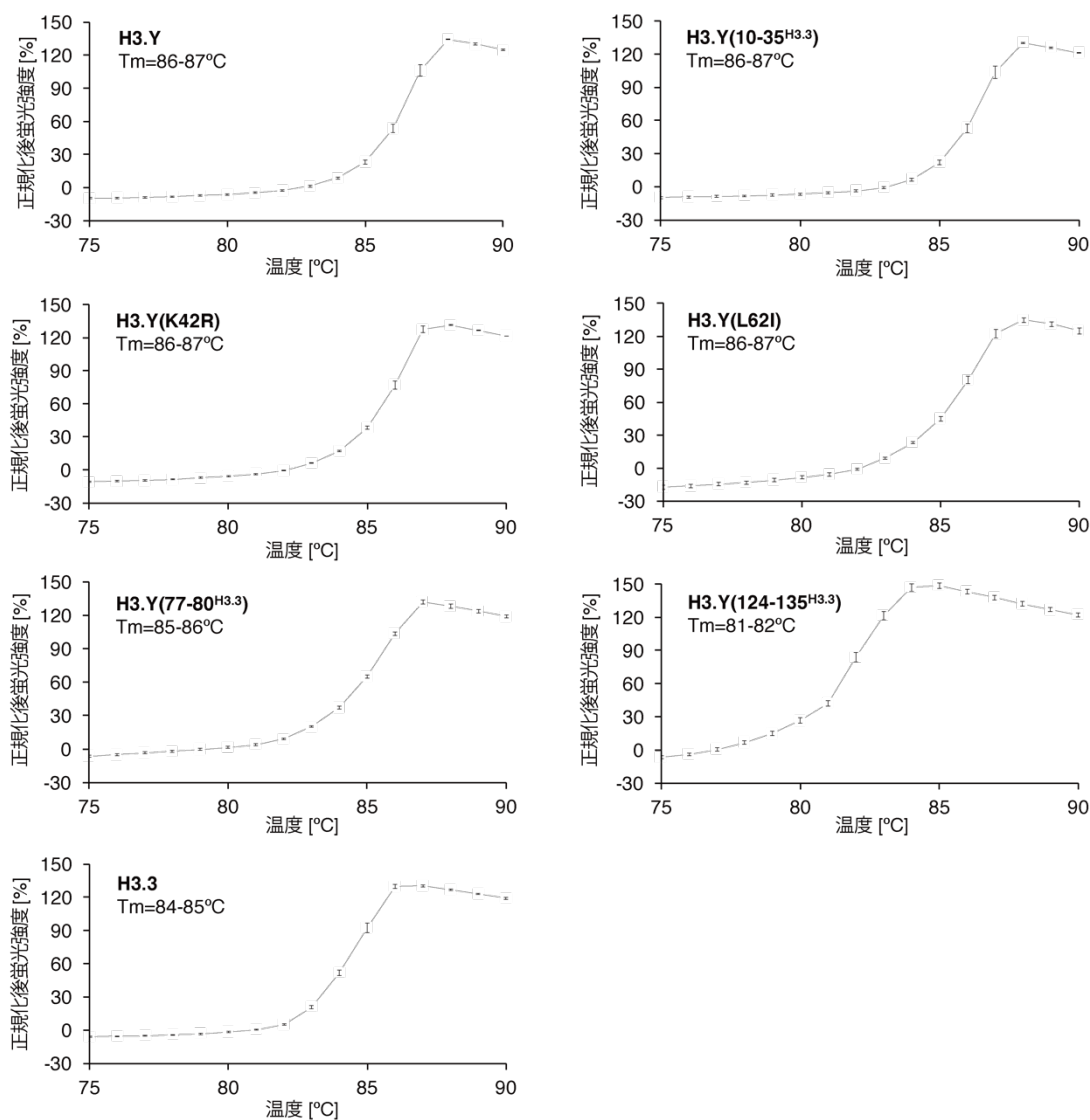


図 14. H3.Y の C 末端領域の変異体を含むテトラソームの熱安定性アッセイ。

H3.Y (10-35^{H3.3})、H3.Y (K42R)、H3.Y (L62I)、H3.Y (77-80^{H3.3})、H3.Y (124-135^{H3.3}) を含むテトラソームの熱変性プロファイルを示した。コントロールとして野生型 H3.Y を含むテトラソーム及び H3.3 を含むテトラソームの結果も示した。実験を 3 回行い、平均値と標準偏差を図に示した。(Kujirai T., et al., 2017, Fig. 2 より引用、改変)

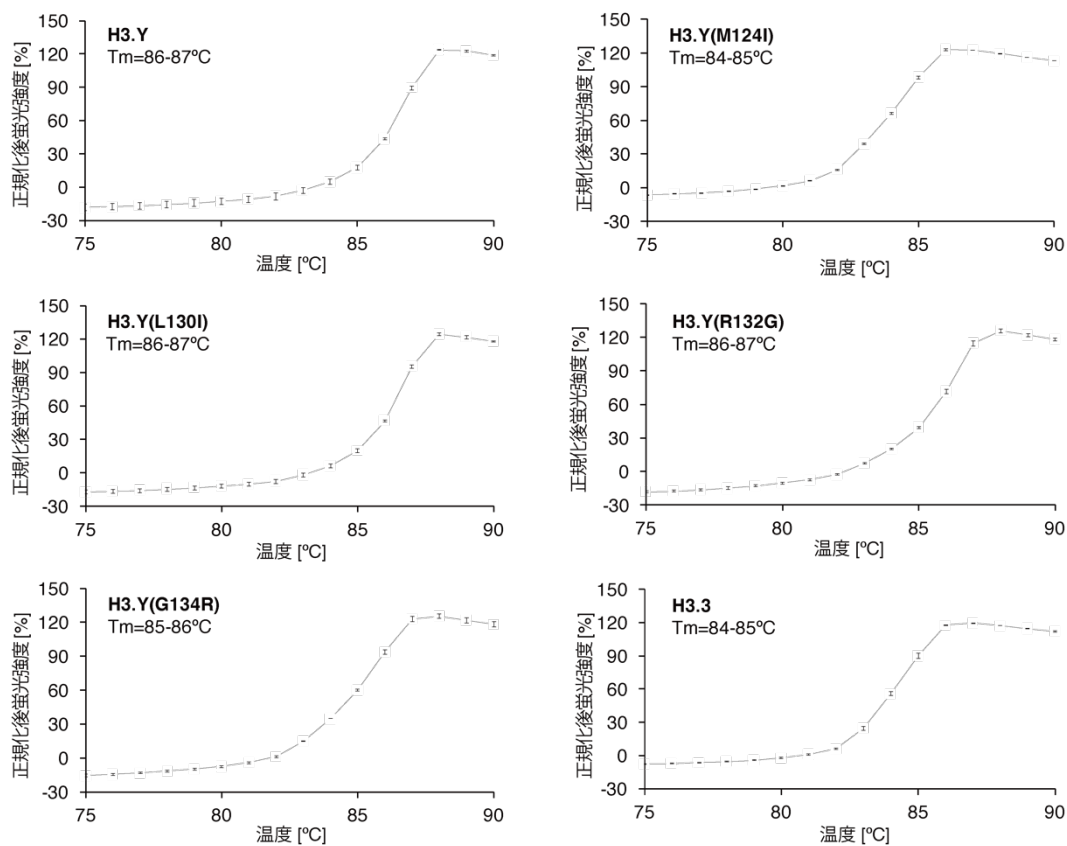
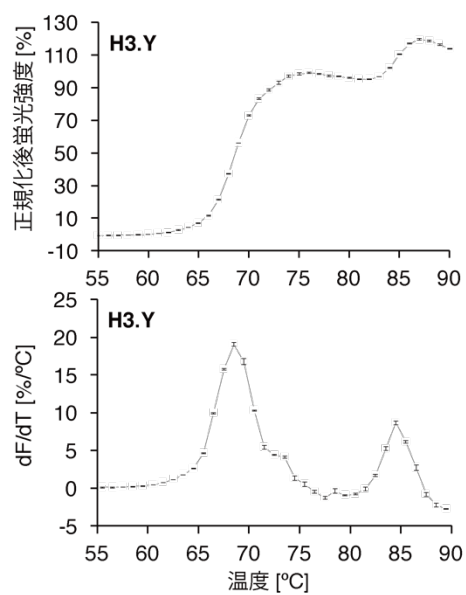


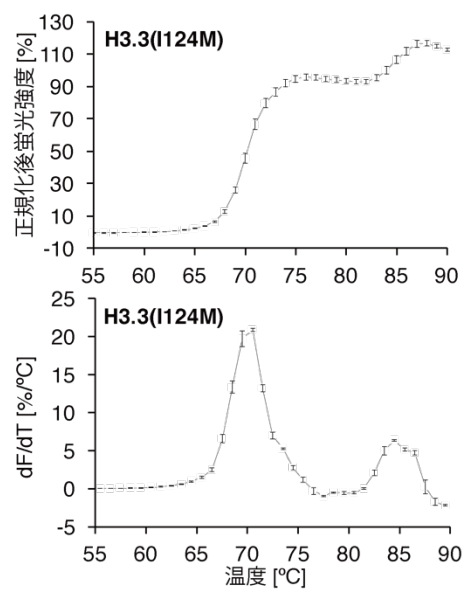
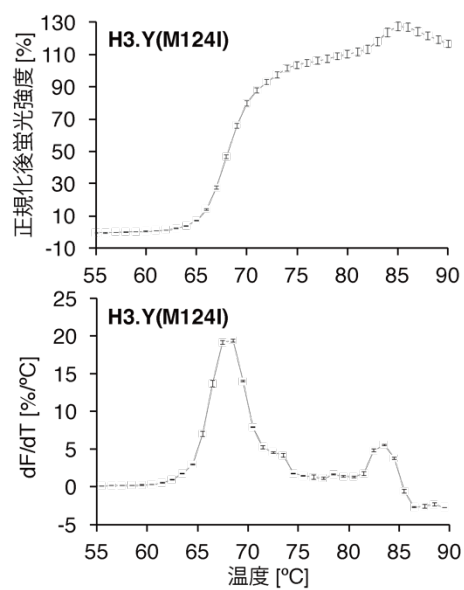
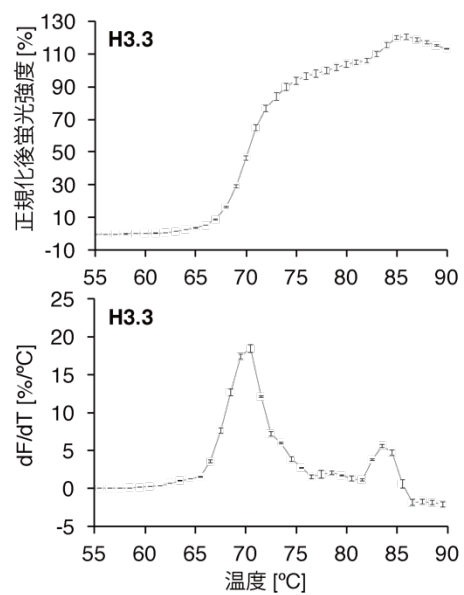
図 15. H3.Y の C 末端領域の変異体を含むテトラソームの熱安定性アッセイ。

H3.Y (M124I)、H3.Y (L130I)、H3.3 (R132G)、H3.3 (G134R) を含むテトラソームの熱変性プロファイルを Tm 値とともに示した。コントロールとして野生型 H3.3 を含むテトラソーム及び H3.Y を含むテトラソームの結果も示した。実験を 3 回行い、平均値と標準偏差を図に示した。(Kujirai T., et al., 2017, Fig. 3 より引用、改変)

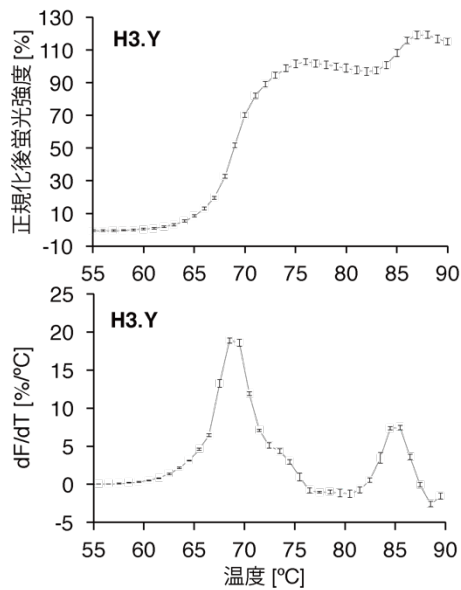
A



B



C



D

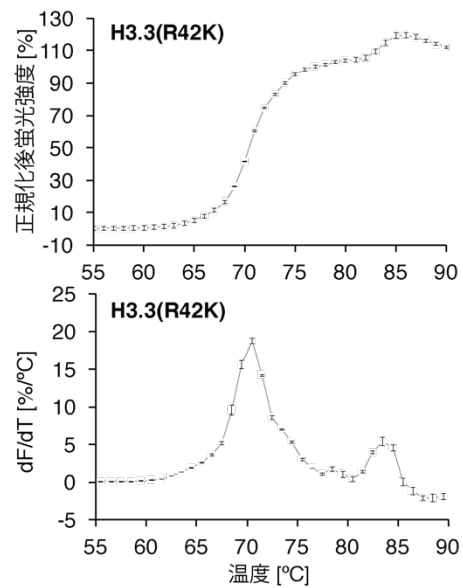
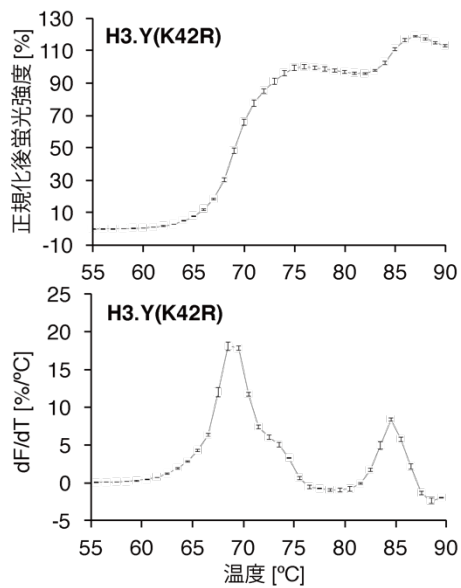
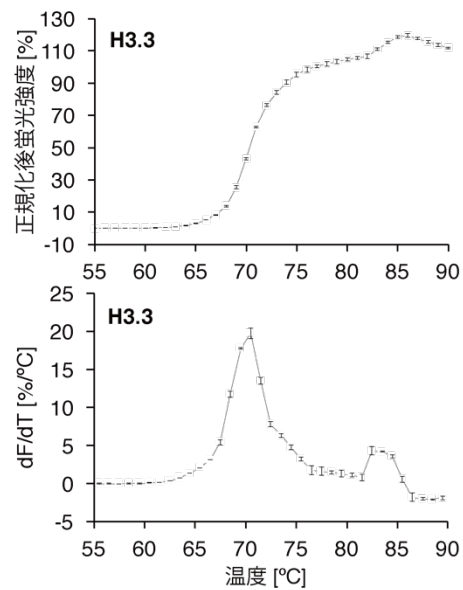


図 16. H3.Y (M124I)、H3.Y (K42R)、H3.3 (I124M)、H3.3 (R42K) を含むヌクレオソームの熱安定性アッセイ。

(A) H3.Y (M124I) を含むヌクレオソームの熱変性プロファイル及び微分プロット (下図)。コントロールとして野生型 H3.Y を含むヌクレオソームの結果も示した (上図)。

(Kujirai T., et al., 2017, Fig. 4B より引用、改変) (B) H3.3 (I124M) を含むヌクレオソームの熱変性プロファイル及び微分プロット (下図)。コントロールとして野生型 H3.3 を含むヌクレオソームの結果も示した (上図)。(Kujirai T., et al., 2017, Fig. 4C より引用、改変)

り引用、改変) (C) H3.Y (K42R) を含むヌクレオソームの熱変性プロファイル及び微分プロット (下図)。コントロールとして野生型 H3.Y を含むヌクレオソームの結果も示した (上図)。(Kujirai T., et al., 2017, Fig. 4E より引用、改変) (D) H3.3 (R42K) を含むヌクレオソームの熱変性プロファイル及び微分プロット (下図)。コントロールとして野生型 H3.3 を含むヌクレオソームの結果も示した (上図)。実験を 3 回行い、平均値と標準偏差を図に示した。(Kujirai T., et al., 2017, Fig. 4F より引用、改変)

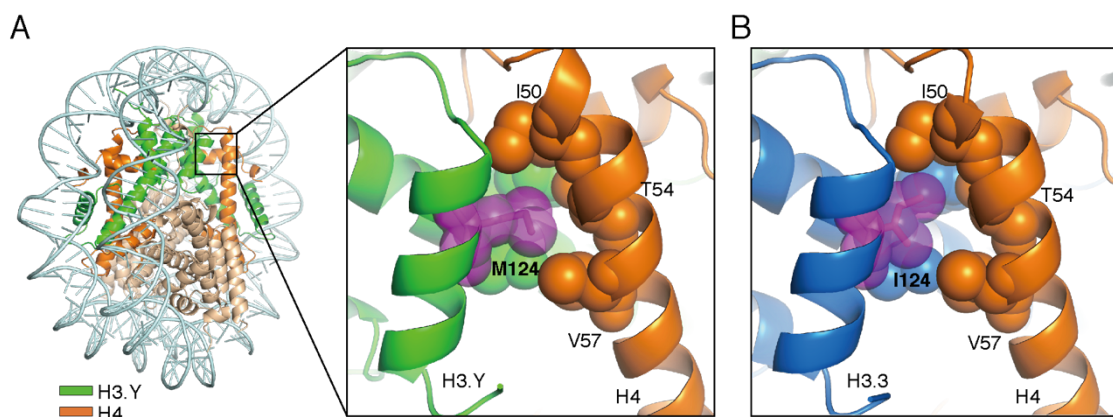


図 17. H3.Y ヌクレオソーム及び H3.3 ヌクレオソームにおける 124 番目のアミノ酸周辺の構造。

(A) H3.Y の M124 周辺の H3.Y 及び H4 のインターフェース (PDB code : 5AY8)。

(B) H3.3 の I124 周辺の H3.3 及び H4 のインターフェース (PDB code : 3AV2)。

H3.Y 及び H3.3 をそれぞれ緑色、青色に色付けした。H4 を橙色に色付けした。124 番目を中心とする疎水性コアに含まれるアミノ酸を球体表示で示した。(Kujirai T., et al., 2017, Fig. 5 より引用、改変)

3-7 H3.3 及び H3.Y を含むヘテロヌクレオソームの再構成及び機能解析

生体内において H3.Y は、一分子のヌクレオソーム内において H3.3 と H3.Y を一分子ずつ含むヘテロヌクレオソームを形成していることが示唆されている (Wiedemann SM., et al., 2010)。H3.Y 及び H3.3 を両方含むヘテロヌクレオソームが実際に形成されるのか、そして、ヘテロヌクレオソームにおいても H3.Y の DNA 末端の高い運動性及び H1 の結合を抑制する性質が保存されているかを明らかにするため、H3.Y 及び H3.3 を含むヘテロヌクレオソームの再構成を行った (図 18A, B)。再構成は、Arimura Y., et al., 2014 を参考に行った。まず、N 末端に His₆-SUMO タグを付加した H3.3 を精製し (His₆-SUMO-H3.3)、H2A、H2B、H3.Y、His₆-SUMO-H3.3 及び H4 を用いてヒストン八量体の再構成及び、ヌクレオソームの再構成を行った。再構成されたヌクレオソームには、His₆-SUMO-H3.3 を二分子含むホモヌクレオソーム、H3.Y を二分子含むホモヌクレオソーム、及び His₆-SUMO-H3.3 と H3.Y を一分子ずつ含むヘテロヌクレオソームの 3 種類のヌクレオソームの混合物となっている。これらのヌクレオソームは、非変性ゲルにて展開した場合、分子量が大きい程電気泳動度が小さいため、電気泳動度の差を利用することで His₆-SUMO-H3.3 と H3.Y を一分子ずつ含むヘテロヌクレオソームを精製することが可能である。146 塩基対及び 193 塩基対の DNA を用いてヌクレオソームの再構成を行い、分取用電気泳動装置 Prep Cell を用いて非変性電気泳動によりヘテロヌクレオソームを精製した。146 塩基対の DNA を含むヘテロヌクレオソームの精製結果を図 18C に示す。このように精製したヘテロヌクレオソームには、His₆-SUMO タグが付加されているため、プレジジオンプロテアーゼによりタグの切断を行

い (図 18D)、更に再度非変性ゲルを用いて電気泳動により精製した (図 18E)。本結果から、試験管内において、H3.Y は、H3.3 との組み合わせにおいてヌクレオソームを形成することが明らかになった (図 18A, B)。このように調製したヌクレオソームを用いて、マイクロコッカルヌクレアーゼに対する感受性を解析した (図 19A, B)。その結果、H3.Y 及び H3.3 を含むヘテロヌクレオソームは、H3.3 を含むホモヌクレオソームと比較して、マイクロコッカルヌクレアーゼに対する感受性が高いことが明らかになった。未消化の 146 塩基対 DNA のバンドの定量結果から、H3.Y 及び H3.3 を含むヘテロヌクレオソームは、H3.Y を二分子含むホモヌクレオソーム及び H3.3 を二分子含むホモヌクレオソームの中間程度の感受性を示した (図 19B)。この結果から、H3.Y 及び H3.3 を含むヘテロヌクレオソームにおいても、H3.Y による DNA 末端の運動性が保存されていることが明らかになった。さらに、H1 結合アッセイを行った結果、H3.Y 及び H3.3 を含むヘテロヌクレオソームでは、H3.3 を含むホモヌクレオソームと比較して、H1 の結合効率が低いことが明らかになった (図 19C, D)。定量結果から、H1 の結合効率は H3.Y を含むホモヌクレオソームに比較的近いことから (H1 の濃度が $0.65\ \mu\text{M}$ のとき、H3.3 は約 60%、H3.Y は約 25%、H3.Y/H3.3 は約 30%程度の結合効率)、ヌクレオソーム中に H3.Y を一分子含むことで H1 の結合効率が顕著に阻害されることが明らかになった (図 19D)。H1 は、ヌクレオソームの両側のリンカーDNA に結合することから、片側のリンカーDNA の運動性が高いために結合効率が低下した可能性が考えられる。以上の結果から、H3.Y による DNA 末端の運動性及び H1 の結合を抑制する性質は、H3.Y 及び H3.3 を含むヘテロヌクレオソームにおいても保存されていることが明らかになった。

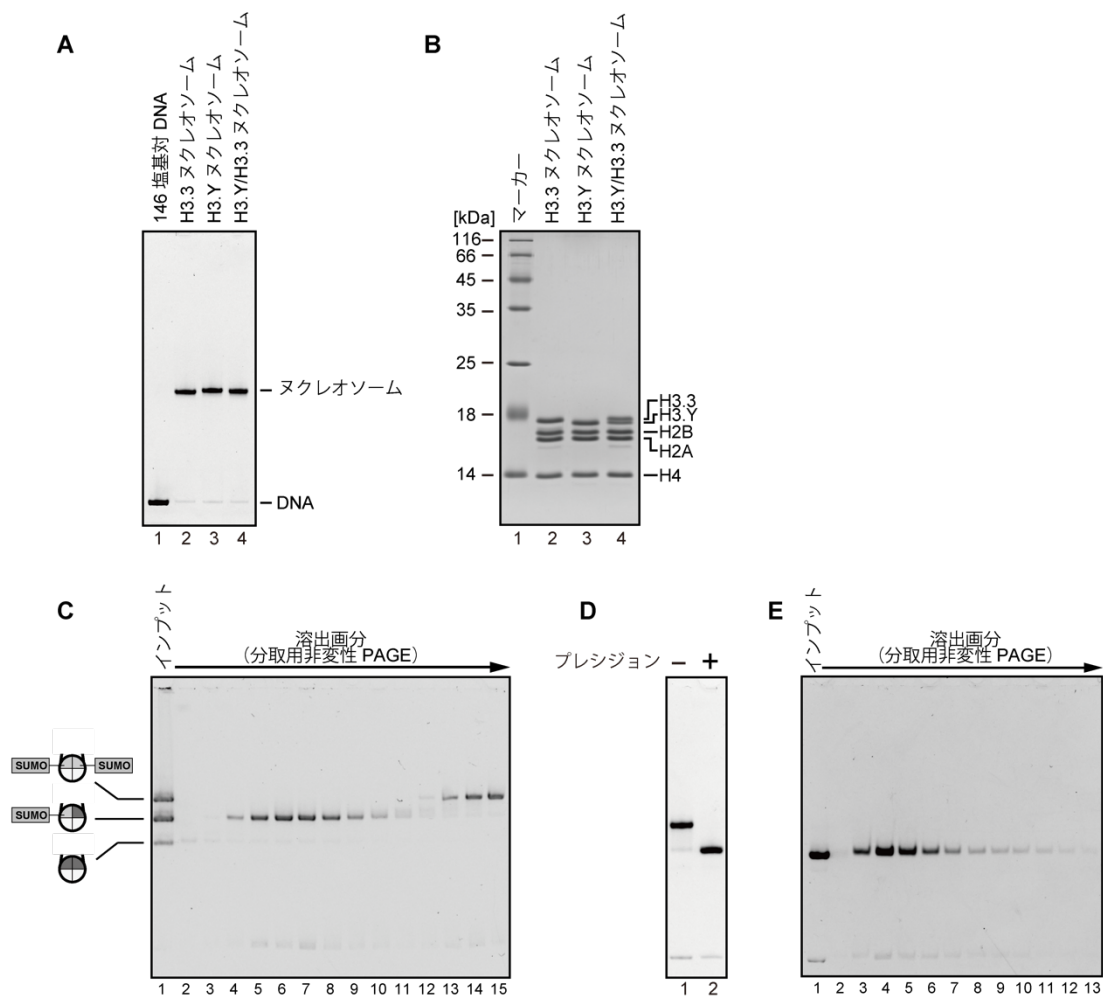


図 18. H3.Y 及び H3.3 を一分子ずつ含むヌクレオソームの再構成。

(A) 精製後の H3.3、H3.Y、H3.Y/H3.3 を含むヌクレオソームを非変性 PAGE により展開し、EtBr 染色を行った。(Kujirai T., et al., 2016, Supplementary Fig. S6A より引用、改変) (B) 精製後の H3.3、H3.Y、H3.Y/H3.3 ヌクレオソームのヒストンの組成を SDS-PAGE により解析した。電気泳動後、CBB により染色を行った。(Kujirai T., et al., 2016, Supplementary Fig. S6B より引用、改変) (C) His₆-SUMO-H3.3 を二分子含むヌクレオソーム、H3.Y 及び His₆-SUMO-H3.3 を一分子ずつ含むヌクレオソーム、H3.Y を二分子含むヌクレオソームを、分取用非変性 PAGE により精製した。レーン 1 はインプットサンプル、レーン 2-15 は、電気泳動により分離された画分を示す。(Kujirai T., et al., 2016, Supplementary Fig. S6D より引用、改変) (D) プレシジョンプロテアーゼによる H3.Y/His₆-SUMO-H3.3 ヌクレオソームからの His₆-SUMO 切断 (Kujirai T., et al., 2016, Supplementary Fig. S6E より引用、改変)。 (E) His₆-SUMO タグが切断され

た H3.Y/H3.3 を含むヘテロヌクレオソームの精製。(Kujirai T., et al., 2016, Supplementary Fig. S6F より引用、改変)

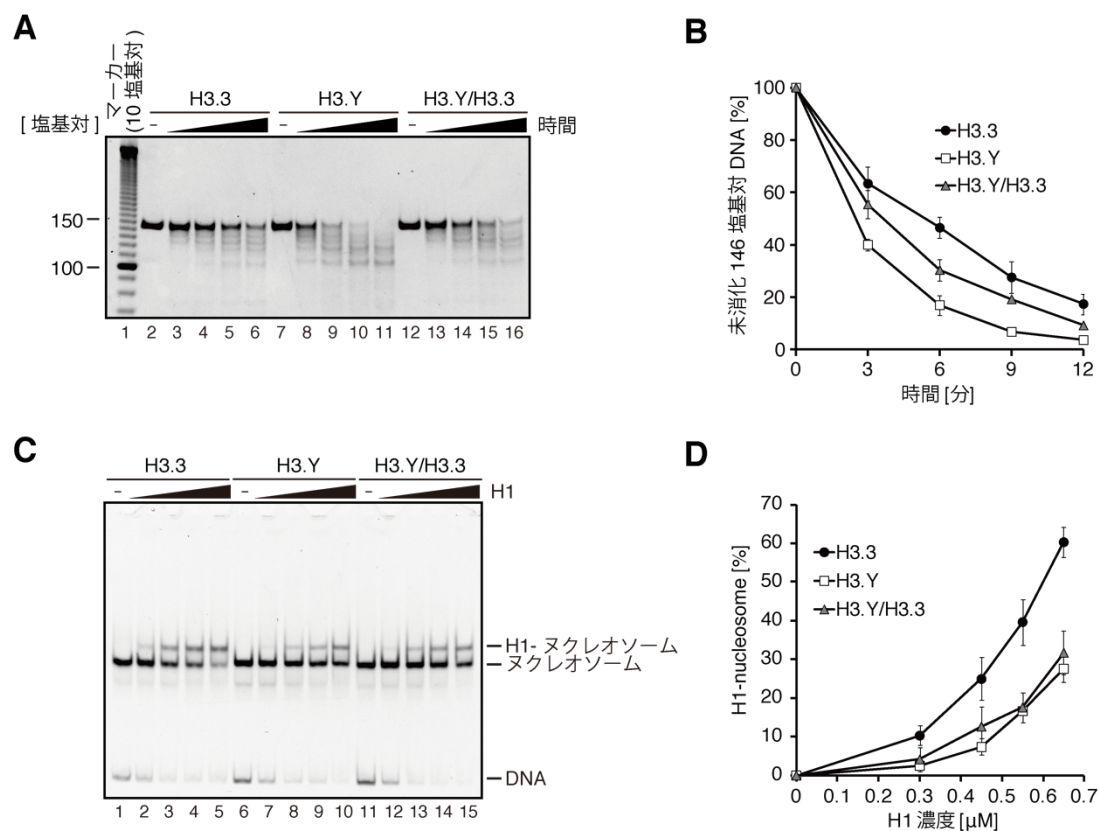


図 19. H3.Y 及び H3.3 を一分子ずつ含むヌクレオソームの生化学的解析。

(A) マイクロコッカスヌクレアーゼアッセイ。146塩基対のDNAを含むH3.3 (レーン 2-6)、H3.Y (レーン 7-11)、H3.Y/H3.3 (レーン 12-16) ヌクレオソームをマイクロコッカスヌクレアーゼ存在下で、0、3、6、9、及び12分反応させた。反応後のサンプルを除タンパク後、非変性PAGEにより展開し、EtBr染色を行った。(Kujirai T., et al., 2016, Fig. 8A より引用、改変) (B) マイクロコッカスヌクレアーゼアッセイの定量結果。未消化の146塩基対DNAを定量し、平均値をプロットした。エラーバーは標準偏差を示す (n=3)。Kujirai T., et al., 2016, Fig. 8B より引用、改変) (C) H1結合アッセイ。H1 (0 μ M: レーン 1, 6 及び 11; 0.3 μ M: レーン 2, 7 及び 12; 0.45 μ M: レーン 3, 7 及び 13; 0.55 μ M: レーン 4, 8 及び 14; 0.65 μ M: レーン 5, 9 及び 15) と193塩基対のDNAを含むH3.3 (レーン 1-5)、H3.Y (レーン 6-10)、H3.Y/H3.3 (レーン 11-15) ヌクレオソームをNap1 (0.3 μ M) 存在下で反応させた。反応後、サンプルを非変性PAGEにより展開し、EtBr染色を行った。(Kujirai T., et al., 2016, Fig. 8C より引用、改変) (D) H1結合アッセイの定量結果。H1とヌクレオソームの複合体のバンド及びヌクレオソームのバンドを定量し、H1の結合効率を算出し平均値をプロットした。

エラーバーは標準偏差を示す (n=3)。(Kujirai T., et al., 2016, Fig. 8D より引用、改変)

第4章 総合討論

4-1 序

H3.Y は、2010 年に霊長類特異的なヒストン H3 バリエントとして、H3.X とともに発見された (Wiedemann SM., et al., 2010)。先行研究より、H3.Y の mRNA はヒトの精巣、及び視床を除く脳の組織から検出されている。さらに、乳がん、肺がん、骨肉腫、卵巣がんなどのがん組織においても mRNA の発現が確認されている。また、ヒト骨肉腫細胞である U2OS 細胞において、飢餓状態及び高密度培養において発現レベルが増加することが確認されている。これらの知見から、H3.Y は組織特異的な発現パターンを示し、培養細胞では外部刺激に応答して発現するヒストンバリエントであることが考えられている (Wiedemann SM., et al., 2010)。H3.Y の発現レベルは、大変低いことから、H3.Y は組織分化やがん化において、特定の遺伝子座におけるクロマチン構造に影響を与えている可能性が考えられる。

これまでの解析から、U2OS 細胞において、H3.Y はユークロマチン領域に存在し、また H3.Y のノックダウンにより多くの遺伝子の発現レベルが下がることが報告されている。これらの事実は、H3.Y が、転写の活性化に関与していることを示唆している (Wiedemann SM., et al., 2010)。しかし、H3.Y がクロマチン構造に与える影響及び、転写の活性化に関与する機構については明らかになっていなかった。九州大学生体防御医学研究所大川恭行研究室との共同研究により、異所的に発現させた GFP 融合 H3.Y は活発に転写が起こっている遺伝子の転写開始点周辺に局在することを明らかにしている (Kujirai T., et al., 2016)。さらに、東京工業大学科学技術創成研究院細胞制御工学研究センター木村宏研究室との共同研究により、H3.Y の細胞内におけるクロマチン結

合の安定性について fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) 法により解析を行い、結果として H3.Y が H3.3 と同程度に安定的にクロマチンに留まることを明らかにしている (Kujirai, et al., 2016)。これらの結果は、H3.Y が遺伝子領域に安定的に局在し、クロマチン構造を変化させることで転写の活性化に関与する可能性を示唆している。

4-2 H3.Y がクロマチン構造に与える影響についての考察

本研究では、H3.Y がクロマチン構造に与える影響を明らかにするため、構造生物学的解析及び生化学的解析を行ってきた。本研究から、主に 3 つの知見が得られた。(1) H3.Y を含むヌクレオソームの DNA 末端の運動性が高いため、H1 の結合効率が低く、緩んだクロマチンを形成すること (図 8、図 9、図 10)、(2) H3.Y を含むヌクレオソームは、H2A-H2B 二量体が放出しやすい一方で、H3.Y-H4 四量体は安定に DNA に結合しクロマチンに安定に留まる性質を持つこと (図 13)、(3) DNA 末端の運動性が高い性質及び、H1 の結合を抑制する性質は、H3.Y が生体内で主に形成する H3.Y 及び H3.3 を含むヘテロヌクレオソームにおいても保存されていることが明らかになった (図 19)。本研究から得られた知見及び、これまでの先行研究から考えられるモデルを図 20 に示す。以降、本モデルにおける H3.Y を含むヌクレオソームの性質について議論する。

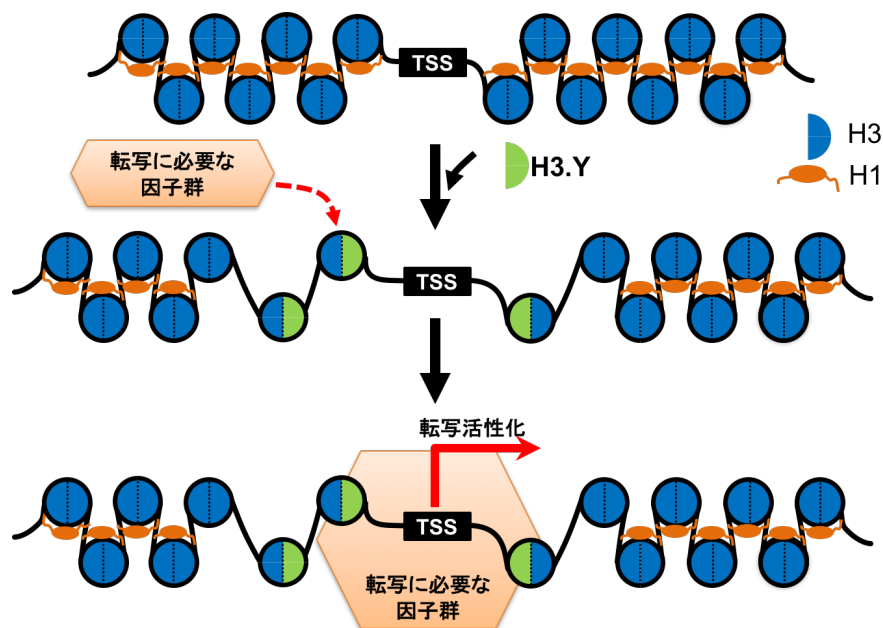


図 20. H3.Y を含むヌクレオソームの機能モデル

H3.Y (緑) は、ヘテロヌクレオソームの状態で転写開始点周辺に形成される。H3.Y を含むヌクレオソームは、H1 の結合効率が低く、緩んだクロマチン構造を形成する。緩んだクロマチン構造に、転写に必要な因子群が結合すると考えられる。H3.Y を含むヌクレオソームの高い安定性により、H3.Y は転写開始点近傍のクロマチンに安定に留まり、緩んだクロマチン構造を維持すると考えられる。この H3.Y 特異的な安定な性質により、発現量が低いにもかかわらず持続的にクロマチン上で機能し、転写活性化状態を維持すると考えられる。(Kujirai T., et al., 2016, Fig. 9 より引用、改変)

4-2-1 H3.Y を含むヌクレオソームが緩んだクロマチンを形成する性質についての考察

H3.Y は、H3.Y/H3.3 ヘテロヌクレオソームにて転写開始点近傍に形成され、DNA 末端の運動性により、H1 の結合を抑制し、緩んだクロマチンを形成すると考えられる (図 20)。DNA 末端の運動性については、これまでにヌクレオソーム breathing モデルが提唱され、DNA 末端の運動性が様々な因子の DNA への結合に重要であると考えられている (Zlatanova J., et al., 2009)。また、ヌクレオソーム breathing によってリンカーヒストン H1 の結合が制御され、様々な因子の DNA の結合が制御されていると考えられている (Bernier., et al., 2015)。さらに、ゲノムワイドな局在解析により、活発に転写されている遺伝子の転写開始点近傍では、マイクロコッカルヌクレアーゼ感受性の高いヌクレオソームが局在し (Mieczkowski J., et al., 2016)、H1 の存在量が少ない傾向があることが報告されている (Izzo A., et al., 2013)。これらの知見から、H3.Y を含む転写開始点近傍では、H3.Y を含むヌクレオソームにおける DNA の末端の高い運動性によって、H1 のクロマチンへの結合が抑制され、緩んだクロマチンを形成することで転写因子や RNA ポリメラーゼ II などの様々な転写に関する因子群を呼び込むことで転写を促進する可能性が考えられる (図 20)。実際に、緩んだ形態のクロマチンを形成するヒストンバリエントとである H2A.B については、H2A.B を含むポリヌクレオソームでは主要型 H2A を含むポリヌクレオソームよりも転写の効率が高いことが明らかにされている (Zhou J., et al., 2007)。H3.Y は生体内では H3.Y 及び H3.3 を含むヘテロヌクレオソームとなることから、片側の DNA 末端の運動性が高い性質を持つヌクレオソームを形成すると考えられる。この性質が転写の方向などに関与している可能性も考えられ、

今後の研究が期待される。

H1 の結合アッセイから、H3.Y の 42 番目のアミノ酸がヌクレオソームの DNA 末端の運動性に重要であることが示唆された (図 12)。H3.Y 特異的な 42 番目のリジンは、霊長類の中でも、ヒトやチンパンジーにおいては保存されているが、アカゲザルでは保存されていない (Wiedemann SM., et al., 2010)。そのため、H3.Y による DNA 末端の運動性は、ヒト及び類人猿におけるクロマチン制御、特に、遺伝子発現制御に影響している可能性が考えられる。

4-2-2 H3.Y を含むヌクレオソームの安定性についての考察

H3.Y は安定にクロマチンに安定に留まる性質を持つため、転写開始点近傍において H3.Y を含むヌクレオソームが形成されると、安定に維持されと考えられる (図 20)。転写が活発に行われている遺伝子の転写開始点近傍では、ヌクレオソームの構造変化が生じていることが明らかにされており (Rhee HS., et al., 2014)、ヌクレオソーム構造の構造変化によって DNA が一時的に露出し、様々な DNA 結合因子が DNA に結合することが DNA の機能発現に重要であることが考えられる。H3.Y を含むヌクレオソームの H2A-H2B 二量体を放出しやすい性質は、H3.Y を含むヌクレオソームがヘキサソームまたはテトラソームを形成しやすいことを示唆している。RNA ポリメラーゼ II がヌクレオソームを通り抜ける際には、ヌクレオソームがヘキサソーム構造となることが知られている (Kireeva ML., et al., 2002, Venkatesh S. and Workman JL., 2015)。実際に、活発に転写が起こっている転写開始点近傍では、H2A-H2B 二量体がヌクレオソームから解離したヘキサソームなどのサブヌクレオソーム構造が形成されており (Rhee HS.,

et al., 2014)、また、活発に転写されている遺伝子領域では、H2A-H2B 二量体が H3-H4 四量体の半分程度の量になっていることが明らかにされている (Cole HA., et al., 2014)。これらの知見から、H3.Y を含むヌクレオソームが H2A-H2B 二量体を放出しやすい性質は、DNA へ様々な因子の結合を可能にし、RNA ポリメラーゼの通過の効率を高める可能性が考えられる。H3.Y を含むヌクレオソームの立体構造において、H2A-H2B 二量体と H3.Y 特異的なアミノ酸の直接的な相互作用は無いことから、H3.Y を含むヌクレオソームが H2A-H2B 二量体を放出しやすい性質の原因として、H3.Y 特異的なアミノ酸によるアロステリックな効果や、今回結晶構造では観測できなかったヒストンテールによる影響が考えられる。

H3.Y-H4 テトラマーが DNA に安定に結合する性質は H3.Y が転写開始点に安定に留まるために寄与すると考えられる。実際に、細胞内において H3.Y が安定的にクロマチンに留まることが明らかになっている (Kujirai., et al., 2016)。このような性質から H3.Y は生体内での存在量が少ないが、安定的に留まることで特定の遺伝子領域の転写開始点の緩んだクロマチン状態を維持する機能を持つと考えられる。また、転写開始点において、ヌクレオソームが存在する場合は、ヌクレオソームが存在しない場合よりも転写が活性化されることが報告されている (Nagai S., et al., 2017)。そのメカニズムとして、転写活性化タンパク質群が、ヒストン H3 に結合して集積することが考えられている。そのため、H3.Y が転写開始点周辺に安定に留まることで、活発な転写状態を維持する機能が考えられる。

網羅的な変異体解析の結果、H3.Y-H4 テトラソームの安定性の原因アミノ酸は、124 番目のメチオニンであることが明らかになった (図 14、図 15、図 16、図 17)。このメチオニンは、ヒト、チンパンジー、アカゲザルにおいて保存されていることから

(Wiedemann SM., et al., 2010)、旧世界ザルまで保存されている可能性が考えられる。クロマチンに安定に留まるという性質が、霊長類において H3.Y の機能として重要なものかもしれない。今後、さらなるゲノム解析により、メチオニンの保存性についての解析が期待される。

4-3 H3.Y とヒストンシャペロンの関係

最近 Hake らのグループから、H3.Y の相互作用因子についての論文が発表され、H3.Y のクロマチン取り込み機構についての知見が得られた (Zink LM., et al., 2017)。H3.Y はヒストンシャペロン DAXX への結合能を欠いており、HIRA によってクロマチンに取り込まれるということが示唆された (Zink LM., et al., 2017)。HIRA は、遺伝子領域や、DNA 修復部位周辺に H3.3 を取り込ませるヒストンシャペロンである (Goldberg AD., et al., 2010, Ray-Gallet D., et al., 2011)。本知見は、H3.Y が遺伝子領域や転写開始点近傍に取り込まれるという局在解析と矛盾せず、HIRA と結合することで転写開始点近傍に取り込まれることが強く示唆される (Kujirai T., et al., 2016)。しかし、HIRA による H3.Y-H4 二量体もしくは H3.3-H4 二量体の認識機構、さらにクロマチンへ取り込ませる機構については知見が少ない。また、HIRA による H3.Y-H4 二量体と H3.3-H4 二量体の認識における区別の有無についても興味深い。この点に関して、今後のさらなる解析が期待される。

H3.Y は、H3.3 と比較して、転写において機能するヒストンシャペロンである FACT とより多く結合していることが報告されている (Zink LM., et al., 2017)。FACT は、RNA ポリメラーゼが転写する際に、ヌクレオソームをヘキサソーム構造へ変換し、RNA

ポリメラーゼを効率良くヌクレオソームを通過させると考えられている因子である (Belotserkovskaya R., et al., 2003, Venkatesh S. and Workman JL. 2015) FACT は、H2A-H2B 二量体をヌクレオソームから解離させヘキサソーム構造に変換した後、ヘキサソーム構造中の H3-H4 四量体に結合すると考えられている (Tsunaka Y., et al., 2016)。FACT と H3-H4 四量体の結晶構造から、FACT が H3 の 115 番目のリジンと相互作用していることが明らかにされている (Tsunaka Y., et al., 2016)。H3.Y において 115 番目のアミノ酸はアルギニンであるため、H3.Y-H4 四量体と FACT の相互作用は H3.3-H4 四量体とは異なり、H3.Y-H4 四量体に FACT が安定に結合できるのかもしれない。また、H3.Y を含むヌクレオソームは、H2A-H2B 二量体を解離しやすいという性質から、FACT の結合効率が高いヌクレオソームであるのかもしれない。もしそうであれば、このような FACT が H3.Y を含むヌクレオソームに結合しやすく、構造変換を行いやすいという性質も、H3.Y による転写の活性化のメカニズムであると考えられる。

4-4 今後の展望

H3.Y は、2010 年に報告されたヒストンバリエントであり、未だ様々な疑問が残っている。H3.Y は、H3.1 及び H3.3 とはそれぞれ、30 及び 26 アミノ酸異なっており、特に、ヒストン翻訳後修飾受ける部位、またはその周辺が異なっている。例を挙げると、9 番目や 27 番目のリジンは、メチル化やアセチル化修飾を受けることが知られているが、これらのアミノ酸周辺の配列が異なっていることから、修飾酵素の基質認識に変化が起こる可能性が考えられる。また、主要型 H3 の 115、122 番目はリジンであり、プ

ロモーターやエンハンサー領域ではアセチル化を受けることが知られているが (Tropberger P., et al., 2013)、H3.Y においてはアルギニンとなっており、アセチル化を受けない。さらに、H3.3 を認識するタンパク質群の基質認識にも変化が生じる可能性が考えられる。転写伸長に関与する因子である ZMYND11 は、H3.3 の 36 番目のトリメチル化リジンと H3.3 特異的 31 番目のセリンを認識して結合する (Wen H., et al., 2014)。H3.Y では 31 番目は、プロリンであり、ZMYND11 の基質認識に変化が生じる可能性が考えられる。これらの知見から、H3.Y では様々な部位において主要型 H3.1 や、H3.3 とは異なる翻訳後修飾が入る可能性や、認識タンパク質が異なる可能性が考えられ、このような相互作用の差異により H3.Y の特異的な機能が実現している可能性が考えられる。

Hake らの解析により、H3.Y が HIRA 依存的にクロマチンに取り込まれ、H3.3 との組み合わせにおいて、ヘテロヌクレオソームを形成している可能性が示唆された (Zink LM., et al., 2017, Wiedemann SM., et al., 2010)。本研究により、試験管内において H3.Y が H3.3 との組み合わせにおいてヘテロヌクレオソームを形成することが明らかになったが、ヌクレオソーム中において、HIRA によりどのように一分子の H3-H4 二量体が抜き取られ、H3.Y-H4 二量体が挿入されるのか、その詳細なメカニズムは分かっていない。ヌクレオソーム中におけるヒストン交換反応の詳細な機構の解明が期待される。

H3.Y についてのゲノムワイドな局在解析により、H3.Y は活発に転写が起きている転写開始点周辺に局在していることが明らかになった (Kujirai T., et al., 2016)。活発に転写が起きている転写開始点周辺には、H2A バリエントである H2A.Z が局在していることが知られており、これまでに、H2A.Z は H3.3 との組み合わせにおいて二種類のヒストンバリエントを含むヌクレオソームが形成されることが報告されている (Jin C., et

al., 2009)。H3.Y が転写開始点周辺に局在することから、転写開始点周辺において H2A.Z と共局在してしている可能性が考えられるが、H2A.Z との組み合わせにおいて、ヌクレオソームを形成するののかについては定かではない。また、このような特殊なヌクレオソームが形成された際には、二種類のバリエーションを特異的に認識するタンパク質が存在するののかについても興味深い。試験管内における再構成実験や、質量分析を用いた相互作用因子の探索実験を行うことで明らかにできると考えられる。

H3.3 の局在を制御する因子として、DEK が報告されている (Ivanauskiene K., et al., 2014)。DEK は、転写、DNA 複製、DNA 修復、スプライシングに関与していることが考えられている因子である (Privette Vinnedge LM., et al., 2013)。ゲノムワイドな局在解析から、DEK は活発に転写が起こっている転写開始点周辺に局在することが報告されていることから (Sandén C., et al., 2014)、H3.Y と同様の局在パターンを示す可能性が考えられ、相互作用する可能性が考えられる。また一方で、DEK は HIRA 依存的な H3.3 のクロマチンへの取り込みを阻害しているという報告もあり (Ivanauskiene K., et al., 2014)、HIRA 依存的にクロマチンに取り込まれる H3.Y は、DEK によってクロマチンへの取り込みが阻害される可能性も考えられる。実際に H3.Y が DEK と相互作用するのか、局在制御されているのかについては今後の解析が期待される。

H3.Y は霊長類に特異的なヒストンバリエーションであり、組織特異的な発現パターンを示すことが考えられているが、どのような場面にて H3.Y による特殊なクロマチン制御が必要になるのか、その意義についての知見はほとんど無い。これまでの先行研究から、胎児の海馬の神経細胞において発現していることが免疫染色により明らかにされている (Wiedemann SM., et al., 2010)。霊長類特異的な遺伝子群は、脳及び生殖器において発現する傾向が知られており (Tay SK., et al., 2009)、H3.Y は脳及び生殖器において

の機能している可能性が考えられる。これらの可能性を検証するために、様々な組織における免疫染色による H3.Y の発現パターンの解析が期待される。また、H3.Y を発現する組織において内在性の H3.Y を抗原とする抗体を用いて、H3.Y のゲノム上での局在解析を行うことで、H3.Y による遺伝子発現制御が必要な遺伝子群が明らかになり、霊長類において H3.Y が出現した意義についての知見が得られると考えられる。

引用文献

Ahmad K., Henikoff S. The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. 2002 *Mol Cell*. 9:1191-1200.

Albig W., Ebentheuer J., Klobeck G., Kunz J., Doenecke D. A solitary human H3 histone gene on chromosome 1. 1996 *Hum Genet*. 97:486-491.

Allfrey VG., Faulkner R., Mirsky AE. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. 1964 *Proc Natl Acad Sci. U S A*. 51:786-794.

Arimura Y., Kimura H., Oda T., Sato K., Osakabe A., Tachiwana H., Sato Y., Kinugasa Y., Ikura T., Sugiyama M., Sato M., Kurumizaka H. Structural basis of a nucleosome containing histone H2A.B/H2A.Bbd that transiently associates with reorganized chromatin. 2013 *Sci Rep*. 3:3510.

Arimura Y., Shirayama K., Horikoshi N., Fujita R., Taguchi H., Kagawa W., Fukagawa T., Almouzni G., Kurumizaka H. Crystal structure and stable property of the cancer-associated heterotypic nucleosome containing CENP-A and H3.3. 2014 *Sci Rep*. 4:7115.

Arimura Y., Tachiwana H., Oda T., Sato M., Kurumizaka H. Structural analysis of the hexasome, lacking one histone H2A/H2B dimer from the conventional nucleosome. 2012 *Biochemistry*. 51:3302-3309.

Bannister AJ., Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. 2011 *Cell Res*. 21:381-395.

Bannister AJ., Zegerman P., Partridge JF., Miska EA., Thomas JO., Allshire RC., Kouzarides T. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. 2001 *Nature*. 410:120-124.

Bao Y., Konesky K., Park YJ., Rosu S., Dyer PN., Rangasamy D., Tremethick DJ., Laybourn PJ., Luger K. Nucleosomes containing the histone variant H2A.Bbd organize only 118 base pairs of DNA. 2004 EMBO J. 23:3314-3324.

Bednar J., Garcia-Saez I., Boopathi R., Cutter AR., Papai G., Reymer A., Syed SH., Lone IN., Tonchev O., Crucifix C., Menoni H., Papin C., Skoufias DA., Kurumizaka H., Lavery R., Hamiche A., Hayes JJ., Schultz P., Angelov D., Petosa C., Dimitrov S. Structure and Dynamics of a 197 bp Nucleosome in Complex with Linker Histone H1. 2017 Mol Cell. 66:384-397.

Belotserkovskaya R., Oh S., Bondarenko VA., Orphanides G., Studitsky VM., Reinberg D. FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. 2003 Science. 301:1090-1093.

Bernier M., Luo Y., Nwokelo KC., Goodwin M., Dreher SJ., Zhang P., Parthun MR., Fondufe-Mittendorf Y., Ottesen JJ., Poirier MG. Linker histone H1 and H3K56 acetylation are antagonistic regulators of nucleosome dynamics. 2015 Nat Commun. 6:10152.

Bian C., Xu C., Ruan J., Lee KK., Burke TL., Tempel W., Barsyte D., Li J., Wu M., Zhou BO., Fleharty BE., Paulson A., Allali-Hassani A., Zhou JQ., Mer G., Grant PA., Workman JL., Zang J., Min J. Sgf29 binds histone H3K4me_{2/3} and is required for SAGA complex recruitment and histone H3 acetylation. 2011 EMBO J. 30:2829-2842.

Brush D., Dodgson JB., Choi OR., Stevens PW., Engel JD. Replacement variant histone genes contain intervening sequences. 1985 Mol Cell Biol. 5:1307-1317

Buschbeck M., Hake SB., Variants of core histones and their roles in cell fate decisions, development and cancer. 2017 Nat Rev Mol Cell Biol. 18:299-314.

Bönisch C., Hake SB. Histone H2A variants in nucleosomes and chromatin: more or less stable? 2012 Nucleic Acids Res. 40:10719-10741.

Chadwick BP., Willard HF. A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. 2001 J Cell Biol. 152:375-384.

Chen VB., Arendall WB. 3rd., Headd JJ., Keedy DA., Immormino RM., Kapral GJ., Murray LW., Richardson JS., Richardson DC. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. 2010 Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 66:12-21.

Cole HA., Ocampo J., Iben JR., Chereji RV., Clark DJ. Heavy transcription of yeast genes correlates with differential loss of histone H2B relative to H4 and queued RNA polymerases. 2014 Nucleic Acids Res. 42:12512-12522.

Conde e Silva N., Black BE., Sivolob A., Filipinski J., Cleveland DW., Prunell A. CENP-A-containing nucleosomes: easier disassembly versus exclusive centromeric localization. 2007 J Mol Biol. 370:555-573.

Cremer T., Cremer C. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. 2001 Nat Rev Genet. 2:292-301.

Davey CA., Sargent DF., Luger K., Maeder AW., Richmond TJ. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. 2002 J Mol Biol. 319:1097-1113.

Demeler B., van Holde KE. Sedimentation velocity analysis of highly heterogeneous systems. 2004 Anal Biochem. 335:279-288.

Dorigo B., Schalch T., Bystricky K., Richmond TJ. Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail. 2003 J Mol Biol. 327:85-96.

Doyen CM., Montel F., Gautier T., Menoni H., Claudet C., Delacour-Larose M., Angelov D., Hamiche A., Bednar J., Faivre-Moskalenko C., Bouvet P., Dimitrov S.

Dissection of the unusual structural and functional properties of the variant H2A.Bbd nucleosome. 2006 EMBO J. 25:4234-4244.

Drané P., Ouarrhni K., Depaux A., Shuaib M., Hamiche A. The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. 2010 Genes Dev. 24:1253-1265.

Dyer PN., Edayathumangalam RS., White CL., Bao Y., Chakravarthy S., Muthurajan UM., Luger K. Reconstitution of nucleosome core particles from recombinant histones and DNA. 2004 Methods Enzymol. 375:23-44.

Eirín-López JM., González-Romero R., Dryhurst D., Ishibashi T., Ausió J. The evolutionary differentiation of two histone H2A.Z variants in chordates (H2A.Z-1 and H2A.Z-2) is mediated by a stepwise mutation process that affects three amino acid residues. 2009 BMC Evol Biol. 9:31

Elsässer SJ., Huang H., Lewis PW., Chin JW., Allis CD., Patel DJ. DAXX envelops a histone H3.3-H4 dimer for H3.3-specific recognition. 2012 Nature. 491:560-565.

Emsley P., Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. 2004 Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 60:2126-2132.

Fan JY., Gordon F., Luger K., Hansen JC., Tremethick DJ. The essential histone variant H2A.Z regulates the equilibrium between different chromatin conformational states. 2002 Nat Struct Biol. 9:172-176.

Franklin SG., Zweidler A. Non-allelic variants of histones 2a, 2b and 3 in mammals. 1977 Nature. 266:273-275.

Goldberg AD., Banaszynski LA., Noh KM., Lewis PW., Elsaesser SJ., Stadler S., Dewell S., Law M., Guo X., Li X., Wen D., Chapgier A., DeKever RC., Miller JC., Lee YL., Boydston EA., Holmes MC., Gregory PD., Greally JM., Rafii S., Yang C., Scambler PJ.,

Garrick D., Gibbons RJ., Higgs DR., Cristea IM., Urnov FD., Zheng D., Allis CD. Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. 2010 Cell. 140:678-691.

Hammond CM., Strømme CB., Huang H., Patel DJ., Groth A. Histone chaperone networks shaping chromatin function. 2017 Nat Rev Mol Cell Biol. 18:141-158.

Hansen JC., Lohr D. Assembly and structural properties of subsaturated chromatin arrays. 1993 J Biol Chem. 268:5840-6848.

Heitz E. Das Heterochromatin der Moose. 1928 Jarbuch Wiss. Bot. 69:762-780.

Iouzalén N., Moreau J., Méchali M. H2A.ZI, a new variant histone expressed during *Xenopus* early development exhibits several distinct features from the core histone H2A. 1996 Nucleic Acids Res. 24:3947-3952

Ivanauskienė K., Delbarre E., McGhie JD., Küntziger T., Wong LH., Collas P. The PML-associated protein DEK regulates the balance of H3.3 loading on chromatin and is important for telomere integrity. 2014 Genome Res. 24:1584-1594.

Iwafuchi-Doi M., Donahue G., Kakumanu A., Watts JA., Mahony S., Pugh BF., Lee D., Kaestner KH., Zaret KS. The Pioneer Transcription Factor FoxA Maintains an Accessible Nucleosome Configuration at Enhancers for Tissue-Specific Gene Activation. 2016 Mol Cell. 62:79-91.

Izzo A., Kamieniarz-Gdula K., Ramírez F., Noreen N., Kind J., Manke T., van Steensel B., Schneider R. The genomic landscape of the somatic linker histone subtypes H1.1 to H1.5 in human cells. 2013 Cell Rep. 3:2142-2154.

Jacobs SA., Khorasanizadeh S. Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. 2002 Science. 295:2080-2083.

Jin C., Zang C., Wei G., Cui K., Peng W., Zhao K., Felsenfeld G. H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark 'nucleosome-free regions' of active promoters and other regulatory regions. 2009 Nat Genet. 41:941-945.

Kadota S., Nagata K. Silencing of IFN-stimulated gene transcription is regulated by histone H1 and its chaperone TAF-I. 2014 Nucleic Acids Res. 42:7642-7653.

Kato K., Okuwaki M., Nagata K. Role of Template Activating Factor-I as a chaperone in linker histone dynamics. 2011 J Cell Sci. 124:3254-3265.

Kimura H., Cook PR. Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B. 2001 J Cell Biol. 153:1341-1353.

Kireeva ML., Walter W., Tchernajenko V., Bondarenko V., Kashlev M., Studitsky VM. Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: loss of the H2A/H2B dimer during transcription. 2002 Mol Cell. 9:541-552.

Kornberg RD. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. 1974 Science. 184:868-871.

Kornberg RD., Thomas JO. Chromatin structure; oligomers of the histones. 1974 Science. 184:865-868.

Kujirai T., Horikoshi N., Sato K., Maehara K., Machida S., Osakabe A., Kimura H., Ohkawa Y., Kurumizaka H. Structure and function of human histone H3.Y nucleosome. 2016 Nucleic Acids Res. 44:6127-6141.

Kujirai T., Horikoshi N., Xie Y., Taguchi H., Kurumizaka H. Identification of the amino acid residues responsible for stable nucleosome formation by histone H3.Y. 2017 Nucleus. 8:239-248.

Kurumizaka H., Horikoshi N., Tachiwana H., Kagawa W. Current progress on structural studies of nucleosomes containing histone H3 variants. 2013 *Curr Opin Struct Biol.* 23:109-115.

Lamond AI., Earnshaw WC. Structure and function in the nucleus. 1998 *Science.* 280:547-553.

Lawrence M., Daujat S., Schneider R. Lateral thinking: how histone modifications regulate gene expression. 2016 *Trends Genet.* 32:42-56.

Levchenko V., Jackson B., Jackson V. Histone release during transcription: displacement of the two H2A-H2B dimers in the nucleosome is dependent on different levels of transcription-induced positive stress. 2005 *Biochemistry.* 44:5357-5372.

Li G., Widom J. Nucleosomes facilitate their own invasion. 2004 *Nat Struct Mol Biol.* 11:763-769

Lowary PT., Widom J. New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning. 1998 *J Mol Biol.* 276:19-42.

Luger K., Dechassa ML., Tremethick DJ. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? 2012 *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13:436-447

Luger K., Mäder AW., Richmond RK., Sargent DF., Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. 1997 *Nature.* 389:251-260.

Machida S., Takaku M., Ikura M., Sun J., Suzuki H., Kobayashi W., Kinomura A., Osakabe A., Tachiwana H., Horikoshi Y., Fukuto A., Matsuda R., Ura K., Tashiro S., Ikura T., Kurumizaka H. Nap1 stimulates homologous recombination by RAD51 and RAD54 in higher-ordered chromatin containing histone H1. 2014 *Sci Rep.* 4:4863.

Malik HS., Henikoff S. Phylogenomics of the nucleosome. 2003 Nat Struct Biol. 10:882-891.

Maze I., Noh KM., Soshnev AA., Allis CD. Every amino acid matters: essential contributions of histone variants to mammalian development and disease. 2014 Nat Rev Genet. 15:259-271.

McCoy AJ., Grosse-Kunstleve RW., Adams PD., Winn MD., Storoni LC., Read RJ. Phaser crystallographic software. 2007 J Appl Crystallogr. 40:658-674.

McKinley KL., Cheeseman IM. The molecular basis for centromere identity and function. 2016 Nat Rev Mol Cell Biol. 17:16-29.

Mieczkowski J., Cook A., Bowman SK., Mueller B., Alver BH., Kundu S., Deaton AM., Urban JA., Larschan E., Park PJ., Kingston RE., Tolstorukov MY. MNase titration reveals differences between nucleosome occupancy and chromatin accessibility. 2016 Nat Commun. 7:11485.

Nagai S., Davis RE., Mattei PJ., Eagen KP., Kornberg RD. Chromatin potentiates transcription. 2017 Proc Natl Acad Sci U S A. 114:1536-1541.

Nakayama J., Rice JC., Strahl BD., Allis CD., Grewal SI. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. 2001 Science. 292:110-113.

Nielsen PR., Nietlispach D., Mott HR., Callaghan J., Bannister A., Kouzarides T., Murzin AG., Murzina NV., Laue ED. Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. 2002 Nature. 416:103-107.

Olins AL., Olins DE. Spheroid chromatin units (v bodies). 1974 Science. 183:330-332.

Olins DE., Olins AL. Chromatin history: our view from the bridge. 2003 Nat Rev Mol Cell Biol. 4:809-814

Otwinowski Z., Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. 1997 Methods Enzymol. 276:307-326.

Palmer DK., O'Day K., Wener MH., Andrews BS., Margolis RL. A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones. 1987 J Cell Biol. 104:805-815.

Pehrson JR., Fried VA. MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. 1992 Science. 257:1398-1400

Privette Vinnedge LM., Kappes F., Nassar N., Wells SI. Stacking the DEK: from chromatin topology to cancer stem cells. 2013 Cell Cycle. 12:51-66.

Ranjan A., Wang F., Mizuguchi G., Wei D., Huang Y., Wu C. H2A histone-fold and DNA elements in nucleosome activate SWR1-mediated H2A.Z replacement in budding yeast. 2015 Elife. 4:e06845.

Ray-Gallet D., Woolfe A., Vassias I., Pellentz C., Lacoste N., Puri A., Schultz DC., Pchelintsev NA., Adams PD., Jansen LE., Almouzni G. Dynamics of histone H3 deposition in vivo reveal a nucleosome gap-filling mechanism for H3.3 to maintain chromatin integrity. 2011 Mol Cell. 44:928-941.

Rhee HS., Bataille AR., Zhang L., Pugh BF. Subnucleosomal structures and nucleosome asymmetry across a genome. 2014 Cell. 159:1377-1388.

Ricketts MD., Frederick B., Hoff H., Tang Y., Schultz DC., Singh Rai T., Grazia Vizioli M., Adams PD., Marmorstein R. Ubinuclein-1 confers histone H3.3-specific-binding by the HIRA histone chaperone complex. 2015 Nat Commun. 6:7711.

Rogakou EP., Pilch DR., Orr AH., Ivanova VS., Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. 1998 J Biol Chem. 273:5858-5868.

Rojas JR., Trievel RC., Zhou J., Mo Y., Li X., Berger SL., Allis CD., Marmorstein R. Structure of Tetrahymena GCN5 bound to coenzyme A and a histone H3 peptide. 1999 Nature. 401:93-98.

Roulland Y., Ouarrhni K., Naidenov M., Ramos L., Shuaib M., Syed SH., Lone IN., Boopathi R., Fontaine E., Papai G., Tachiwana H., Gautier T., Skoufias D., Padmanabhan K., Bednar J., Kurumizaka H., Schultz P., Angelov D., Hamiche A., Dimitrov S. The Flexible Ends of CENP-A Nucleosome Are Required for Mitotic Fidelity. 2016 Mol Cell. 63:674-685.

Saeki H., Ohsumi K., Aihara H., Ito T., Hirose S., Ura K., Kaneda Y. Linker histone variants control chromatin dynamics during early embryogenesis. 2005 Proc Natl Acad Sci U S A. 102:5697-5702.

Sandén C., Järvstrå L., Lennartsson A., Brattås PL., Nilsson B., Gullberg U. The DEK oncoprotein binds to highly and ubiquitously expressed genes with a dual role in their transcriptional regulation. 2014 Mol Cancer. 13:215.

Schenk R., Jenke A., Zilbauer M., Wirth S., Postberg J. H3.5 is a novel hominid-specific histone H3 variant that is specifically expressed in the seminiferous tubules of human testes. 2011 Chromosoma. 120:275-285

Schneider R., Grosschedl R. Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. 2007 Genes Dev. 21:3027-3043.

Schwarz PM., Hansen JC. Formation and stability of higher order chromatin structures. Contributions of the histone octamer. 1994 J Biol Chem. 269:16284-16289.

Shintomi K., Iwabuchi M., Saeki H., Ura K., Kishimoto T., Ohsumi K. Nucleosome assembly protein-1 is a linker histone chaperone in *Xenopus* eggs. 2005 *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:8210-8215.

Shukla MS., Syed SH., Goutte-Gattat D., Richard JL., Montel F., Hamiche A., Travers A., Faivre-Moskalenko C., Bednar J., Hayes JJ., Angelov D., Dimitrov S. The docking domain of histone H2A is required for H1 binding and RSC-mediated nucleosome remodeling. 2011 *Nucleic Acids Res*. 39:2559-2570.

Simpson RT. Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. 1978 *Biochemistry*. 17:5524-5531.

Song F., Chen P., Sun D., Wang M., Dong L., Liang D., Xu RM., Zhu P., Li G. Cryo-EM study of the chromatin fiber reveals a double helix twisted by tetranucleosomal units. 2014 *Science*. 344:376-380.

Strahl BD., Allis CD. The language of covalent histone modifications. 2000 *Nature*. 403:41-45.

Suzuki Y., Horikoshi N., Kato D., Kurumizaka H. Crystal structure of the nucleosome containing histone H3 with crotonylated lysine 122. 2016 *Biochem Biophys Res Commun*. 469:483-489.

Syed SH., Goutte-Gattat D., Becker N., Meyer S., Shukla MS., Hayes JJ., Everaers R., Angelov D., Bednar J., Dimitrov S. Single-base resolution mapping of H1-nucleosome interactions and 3D organization of the nucleosome. 2010 *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:9620-9625.

Szenker E., Ray-Gallet D., Almouzni G. The double face of the histone variant H3.3. 2011 *Cell Res*. 21:421-434.

Tachiwana H., Kagawa W., Osakabe A., Kawaguchi K., Shiga T., Hayashi-Takanaka Y., Kimura H., Kurumizaka H. Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific histone variant, human H3T. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 107:10454-10459.

Tachiwana H., Kagawa W., Shiga T., Osakabe A., Miya Y., Saito K., Hayashi-Takanaka Y., Oda T., Sato M., Park SY., Kimura H., Kurumizaka H. Crystal structure of the human centromeric nucleosome containing CENP-A. 2011 *Nature*. 476:232-235.

Tachiwana H., Osakabe A., Kimura H., Kurumizaka H. Nucleosome formation with the testis-specific histone H3 variant, H3t, by human nucleosome assembly proteins in vitro. 2008 *Nucleic Acids Res*. 36:2208-2218.

Tachiwana H., Osakabe A., Shiga T., Miya Y., Kimura H., Kagawa W., Kurumizaka H. Structures of human nucleosomes containing major histone H3 variants. 2011 *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 67:578-583.

Tagami H., Ray-Gallet D., Almouzni G., Nakatani Y. Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. 2004 *Cell*. 116:51-61.

Taguchi H., Horikoshi N., Arimura Y., Kurumizaka H. A method for evaluating nucleosome stability with a protein-binding fluorescent dye. 2014 *Methods*. 70:119-126.

Taguchi H., Xie Y., Horikoshi N., Maehara K., Harada A., Nogami J., Sato K., Arimura Y., Osakabe A., Kujirai T., Iwasaki T., Semba Y., Tachibana T., Kimura H., Ohkawa Y., Kurumizaka H. Crystal structure and characterization of novel human histone H3 variants, H3.6, H3.7, and H3.8. 2017 *Biochemistry*. 56:2184-2196

Talbert PB., Henikoff S. Histone variants on the move: substrates for chromatin dynamics. 2017 *Nat Rev Mol Cell Biol*. 18:115-126

Talbert PB., Henikoff S. Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. 2010 Nat Rev Mol Cell Biol. 11:264-275.

Tay SK., Blythe J., Lipovich L. Global discovery of primate-specific genes in the human genome. 2009 Proc Natl Acad Sci U S A. 106:12019-12024.

Tolstorukov MY., Goldman JA., Gilbert C., Ogryzko V., Kingston RE., Park PJ. Histone variant H2A.Bbd is associated with active transcription and mRNA processing in human cells. 2012 Mol Cell. 47:596-607.

Tropberger P., Pott S., Keller C., Kamieniarz-Gdula K., Caron M., Richter F., Li G., Mittler G., Liu ET., Bühler M., Margueron R., Schneider R. Regulation of transcription through acetylation of H3K122 on the lateral surface of the histone octamer. 2013 Cell. 152:859-872.

Tsunaka Y., Fujiwara Y., Oyama T., Hirose S., Morikawa K. Integrated molecular mechanism directing nucleosome reorganization by human FACT. 2016 Genes Dev. 30:673-686.

Venkatesh S., Workman JL. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. 2015 Nat Rev Mol Cell Biol. 16:178-189.

Vicent GP., Nacht AS., Font-Mateu J., Castellano G., Gaveglia L., Ballaré C., Beato M. Four enzymes cooperate to displace histone H1 during the first minute of hormonal gene activation. 2011 Genes Dev. 25:845-862.

Wen H., Li Y., Xi Y., Jiang S., Stratton S., Peng D., Tanaka K., Ren Y., Xia Z., Wu J., Li B., Barton MC., Li W., Li H., Shi X. ZMYND11 links histone H3.3K36me3 to transcription elongation and tumour suppression. 2014 Nature. 508:263-268.

West MH., Bonner WM. Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species. 1980 *Biochemistry*. 19:3238-3245.

Wiedemann SM., Mildner SN., Bönisch C., Israel L., Maiser A., Matheisl S., Straub T., Merkl R., Leonhardt H., Kremmer E., Schermelleh L., Hake SB. Identification and characterization of two novel primate-specific histone H3 variants, H3.X and H3.Y. 2010 *J Cell Biol*. 190:777-791.

Witt O., Albig W., Doenecke D. Testis-specific expression of a novel human H3 histone gene. 1996 *Exp Cell Res*. 229:301-306.

Zhang Q., Giebler HA., Isaacson MK., Nyborg JK. Eviction of linker histone H1 by NAP-family histone chaperones enhances activated transcription. 2015 *Epigenetics Chromatin*. 8:30.

Zhou BR., Jiang J., Feng H., Ghirlando R., Xiao TS., Bai Y. Structural Mechanisms of Nucleosome Recognition by Linker Histones. 2015 *Mol Cell*. 59:628-638.

Zhou J., Fan JY., Rangasamy D., Tremethick DJ. The nucleosome surface regulates chromatin compaction and couples it with transcriptional repression. 2007 *Nat Struct Mol Biol*. 14:1070-1076.

Zink LM., Delbarre E., Eberl HC., Keilhauer EC., Bönisch C., Pünzeler S., Bartkuhn M., Collas P., Mann M., Hake SB. H3.Y discriminates between HIRA and DAXX chaperone complexes and reveals unexpected insights into human DAXX-H3.3-H4 binding and deposition requirements. 2017 *Nucleic Acids Res*. 45:5691-5706.

Zlatanova J., Bishop TC., Victor JM., Jackson V., van Holde K. The nucleosome family: dynamic and growing. 2009 *Structure*. 17:160-171.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、全面的に御指導、御鞭撻を賜りました、早稲田大学教授、胡桃坂仁志先生に心より御礼申し上げます。充実した環境にて研究させていただきましたことに深く感謝申し上げます。

細胞生物学的解析において多大なる御助力を賜りました、東京工業大学教授、木村宏先生に深く感謝申し上げます。

次世代シーケンサーを用いたゲノム上での局在解析において多大なる御助力と活発な議論を賜りました、九州大学教授、大川恭行先生、並びに九州大学、前原一満博士に深く感謝申し上げます。

研究における基本的な実験操作を御指導いただき、また研究から日常生活に至るまで大変お世話になりました前早稲田大学理工学術院助教、堀越直樹博士、町田晋一博士、佐藤浩一博士、越阪部晃永博士、前早稲田大学理工学術院講師、立和名博昭博士、並びに早稲田大学理工学術院助教、有村泰宏博士、小山昌子博士、小林航博士に心より感謝申し上げます。

胡桃坂研究室の同期として共に切磋琢磨した、加藤大貴氏、並びに、田口裕之氏に深く感謝申し上げます。

最後に、本研究を遂行するにあたり、様々な御協力をいただきました胡桃坂研究室の皆様心より感謝申し上げます。

研究業績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	<p>○<u>Tomoya Kujirai</u>, Naoki Horikoshi, Yan Xie, Hiroyuki Taguchi, Hitoshi Kurumizaka. Identification of the amino acid residues responsible for stable nucleosome formation by histone H3.Y. <i>Nucleus</i>. 8:239-248. 2017.</p> <p>○<u>Tomoya Kujirai</u>, Naoki Horikoshi, Koichi Sato, Kazumitsu Maehara, Shinichi Machida, Akihisa Osakabe, Hiroshi Kimura, Yasuyuki Ohkawa, Hitoshi Kurumizaka. Structure and function of human histone H3.Y nucleosome. <i>Nucleic Acids Research</i>. 44:6127-6141. 2016.</p>
講演	<p>（国際学会発表）</p> <p>○<u>Tomoya Kujirai</u>, Naoki Horikoshi, Koichi Sato, Kazumitsu Maehara, Akihisa Osakabe, Shinichi Machida, Yasuyuki Ohkawa, Hiroshi Kimura, Hitoshi Kurumizaka. Structural characterization of the H3.Y nucleosome. Cold Spring Harbor Asia Conference, CHROMATIN, EPIGENETICS & TRANSCRIPTION. 2016, May, Suzhou, China.</p> <p>○<u>Tomoya Kujirai</u>, Naoki Horikoshi, Koichi Sato, Kazumitsu Maehara, Akihisa Osakabe, Shinichi Machida, Yasuyuki Ohkawa, Hiroshi Kimura, Hitoshi Kurumizaka. The distinct property of histone H3.Y nucleosome. International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function. 2015, August, Awaji, Japan.</p>
その他	<p>（論文）</p> <p><u>Tomoya Kujirai</u>, Shinichi Machida, Akihisa Osakabe, Hitoshi Kurumizaka. Influence of polynucleosome preparation methods on sedimentation velocity analysis of chromatin. <i>The Journal of Biochemistry</i>. 161:381-388. 2017.</p>

その他	<p>(論文)</p> <p>Hiroyuki Taguchi, Yan Xie, Naoki Horikoshi, Kazumitsu Maehara, Akihito Harada, Jumpei Nogami, Koichi Sato, Yasuhiro Arimura, Akihisa Osakabe, <u>Tomoya Kujirai</u>, Takeshi Iwasaki, Yuichiro Semba, Taro Tachibana, Hiroshi Kimura, Yasuyuki Ohkawa, Hitoshi Kurumizaka. Crystal structure and characterization of novel human histone H3 variants, H3.6, H3.7, and H3.8. <i>Biochemistry</i>. 56:2184-2196. 2017.</p> <p>Masako Koyama, Wataru Nagakura, Hiroki Tanaka, <u>Tomoya Kujirai</u>, Yuji Chikashige, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraoka, Hitoshi Kurumizaka. In vitro reconstitution and biochemical analyses of the <i>Schizosaccharomyces pombe</i> nucleosome. <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i>. 482:896-901. 2017.</p> <p>Yuko Sato, <u>Tomoya Kujirai</u>, Ritsuko Arai, Haruhiko Asakawa, Chizuru Ohtsuki, Naoki Horikoshi, Kazuo Yamagata, Jun Ueda, Takahiro Nagase, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraoka, Akatsuki Kimura, Hitoshi Kurumizaka, Hiroshi Kimura. A genetically encoded probe for live-cell imaging of H4K20 monomethylation. <i>Journal of Molecular Biology</i>. 428:3885-3902. 2016.</p> <p>Masaaki Sugiyama, Naoki Horikoshi, Yuya Suzuki, Hiroyuki Taguchi, <u>Tomoya Kujirai</u>, Rintaro Inoue, Yojiro Oba, Nobuhiro Sato, Anne Martel, Lionel Porcar, Hitoshi Kurumizaka. Solution structure of variant H2A.Z.1 nucleosome investigated by small-angle X-ray and neutron scatterings. <i>Biochemistry and Biophysics Reports</i>. 4:28-32. 2015.</p> <p>Yuko Sato, Masanori Mukai, Jun Ueda, Michiko Muraki, Timothy J. Stasevich, Naoki Horikoshi, <u>Tomoya Kujirai</u>, Hiroaki Kita, Taisuke Kimura, Seiji Hira, Yasushi Okada, Yoko Hayashi-Takanaka, Chikashi Obuse, Hitoshi Kurumizaka, Atsuo Kawahara, Kazuo Yamagata, Naohito Nozaki, Hiroshi Kimura. Genetically encoded system to track histone modification in vivo. <i>Scientific Reports</i>. 3:2436. 2013.</p>
-----	---

その他	<p>(国際学会発表)</p> <p><u>Tomoya Kujirai</u>, Yuka Fujino, Akihisa Osakabe, Frederic Berger, Hitoshi Kurumizaka. Structural studies of the nucleosomes of ancient land plant <i>Marchantia polymorpha</i>. EMBO CONFERENCE, The Nucleosome: From Atoms to Genomes. 2017, September, Heidelberg, Germany.</p> <p>(国内学会発表)</p> <p><u>鯨井智也</u>、堀越直樹、胡桃坂仁志 ヒストン H3.Y スクレオソームの構造機能解析 第 34 回染色体ワークショップ・第 15 回核ダイナミクス研究会 2017 年 1 月</p> <p><u>鯨井智也</u>、堀越直樹、佐藤浩一、前原一満、町田晋一、越阪部晃永、大川恭行、木村宏、胡桃坂仁志 遺伝子発現制御に重要な H3.Y スクレオソームの機能解析 第 89 回日本生化学会大会 2016 年 9 月</p> <p><u>鯨井智也</u>、佐藤優子、堀越直樹、木村宏、胡桃坂仁志 ヒストン修飾特異的細胞内発現抗体の機能解析 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 11 月</p> <p><u>鯨井智也</u>、堀越直樹、佐藤浩一、前原一満、越阪部晃永、町田晋一、有村泰宏、立和名博昭、大川恭行、木村宏、胡桃坂仁志 ヒストン H3.Y が形成するクロマチン及びヌクレオソームの機能解析 第 9 回日本エピジェネティクス研究会年会 2015 年 5 月</p> <p>(受賞)</p> <p>若手優秀発表賞、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月</p>
-----	--